

CAPÍTULO 4

INCERTIDUMBRES, RIESGOS Y PELIGROS DE LA LIBERACIÓN  
DE MAÍZ TRANSGÉNICO EN MÉXICO



*Elena R. Álvarez-Buylla, Alma Piñeyro Nelson, Antonio Turrent,  
Ana Wegier, Valeria Alavez, Leonora Milán,  
Terje Traavik, David Quist y Jorge Nieto-Sotelo*

**Introducción**

En octubre de 2009 se aprobaron las primeras siembras experimentales de maíz transgénico en México desde la moratoria *de facto* implementada en 1998, por lo que actualmente estamos frente a la posibilidad de que se apruebe la liberación en el campo mexicano de líneas de maíz transgénico al ambiente en extensiones mayores. Las consideraciones sobre lo deseable y seguro de esta tecnología para nuestro país han sido guiadas por intereses políticos y económicos privados, más que por estudios científicos concluyentes, y mucho menos por consideraciones sociales o ambientales. Estos intereses han moldeado y apresurado un marco regulatorio (la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, LBOGM, en vigor desde 2006 y el reglamento que de ella emana) encaminado a posibilitar la liberación en el campo mexicano de las líneas comerciales de maíz transgénico disponibles. En este escenario, es importante llevar a cabo una reflexión entorno a la liberación de organismos transgénicos en el ambiente, la cual desencadena riesgos y peligros anidados que dependerán del contexto en el cual ocurra la liberación y del tipo de transgénico.

Más aún, en el caso particular del maíz transgénico, se sabe ya que estos desarrollos son obsoletos en términos tanto científicos como tecnológicos, aún en las condiciones de agricultura industrializada para las que fueron creados originalmente, debido a que se basan en un paradigma científico ya superado: un gen determina un rasgo visible (fenotípico) de manera simple y prácticamente independiente del resto de los genes del organismo y del ambiente en donde se desarrolla dicho organismo. Mientras que se desarrollaban los primeros OGM a finales de los ochenta y mediados de los noventa del siglo pasado, este paradigma ya era cuestionado con base en innumerables datos experimentales y modelos formales. Sin embargo, se siguen desarrollando transgénicos con base en este paradigma y son promovidos para su comercialización y liberación en el ambiente sin considerar las consecuencias. ¿Cuáles son los riesgos de dicha liberación?

Para evaluar el riesgo e incertidumbres del uso de una tecnología se han elaborado diferentes protocolos que analizan diferentes niveles en los cuales un desarrollo tecnológico puede presentar peligros, riesgos e incertidumbres. En el caso de los organismos genéticamente modificados, uno de los protocolos más acabados presentados hasta el momento por alguna autoridad nacional o supranacional es el elaborado por el panel científico de la Autoridad Europea de Seguridad de los Alimentos (EFSA, 2006). Este protocolo contempla que el análisis de bioseguridad de un OGM específico debe hacerse en varios niveles y mínimamente incluir: las características biológicas del(los) organismo(s) de donde se obtuvieron las secuencias transgénicas, las características biológicas del organismo receptor, el proceso de transformación genética; las características de la(s) proteína(s) recombinante(s), tanto su toxicidad para el hombre y los animales como la posibilidad de transferencia horizontal de los (trans)genes que las codifican hacia otros organismos, así como los posibles riesgos de su liberación en el ambiente en diversos contextos (ver capítulo 15 para una discusión más profunda entorno al análisis de riesgo y bioseguridad).

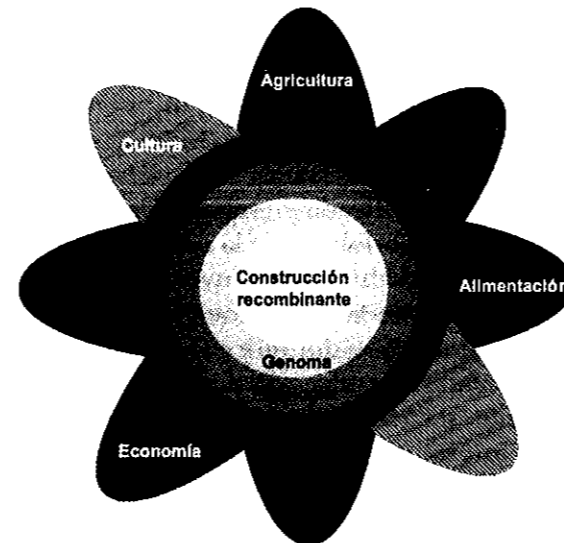
Lo notable de este documento es que hace referencia explícita a que la evaluación de los posibles efectos negativos o peligros de la liberación de un OGM particular tienen que ser caso por caso, y un "caso" está conformado por el OGM mismo y sus características, pero también por el ambiente y el contexto agrícola en el cual se usará, así como por sus posibles usos. Para la liberación en el ambiente de un OGM es necesario evaluar los posibles peligros (que definimos aquí como la fuente

del riesgo y se refiere a una sustancia o a una acción que puede causar daño) y riesgos (la posibilidad de sufrir un daño por la exposición a un peligro) que se hallan contenidos unos en otros —como las muñecas rusas o "matrioska", jerárquicamente, debido a los distintos niveles de organización de los sistemas biológicos—, tomando en cuenta parámetros ecológicos ambiente-específicos, pero también considerando las condiciones socioeconómicas bajo las cuales se usarán estos desarrollos.

De manera muy simplificada y esquemática, los principales niveles de riesgos e incertidumbres son: 1) la construcción recombinante o transgénica propiamente dicha, que incluye el o los genes que codifican para las proteínas objeto de la biotecnología, así como las secuencias reguladoras que determinan en dónde y cuándo se expresará dicho gen, las secuencias que permiten la selección de las plantas que resultan transgénicas y, finalmente, secuencias importantes para la transcripción de él o los gen(es) de interés (Figura 2 y capítulo 3), el contexto genómico y proteómico, así como el fondo genético de la planta receptora en el cual se integrará la construcción recombinante y del cual dependerá el efecto fisiológico o morfológico del transgén; 3) el contexto ambiental en el cual se usará la planta transgénica; 4) el contexto agrícola/tecnológico de la zona o país en donde se liberará la planta transgénica; y 5) el contexto socioeconómico (la cultura, forma de uso, importancia alimenticia, organización de la producción agrícola, distribución, etcétera) de la región y país en donde se usará la planta transgénica bajo evaluación.

El esquema de anidamiento de incertidumbres, riesgos e insuficiencias deja claro que aquellos que surjan en los niveles más internos tendrán implicaciones más generales que los que surjan por fenómenos a niveles superiores, dentro de contextos económicos, sociales y culturales que, si bien operan de manera independiente entre sí, se sobreponen a los niveles inferiores, potenciando (o atenuando) los riesgos e incertidumbres presentes en los niveles basales. Más aún, en las evaluaciones de riesgo, algunos niveles tendrán interacciones más relevantes, por ejemplo, los riesgos e incertidumbres propios del nivel fisiológico de la transformación genética serán más importantes cuando se evalúe la posibilidad de toxinas que afecten la alimentación de la población que los riesgos derivados de la transgénesis *per se* (nivel inferior). En contraste, para evaluar la posibilidad de flujo génico, el nivel agroecológico será el más relevante, tanto en las consideraciones de impacto social, como económico (ver Figura 1). Así, los efectos que se derivan de factores o

Figura 1.



Niveles de riesgo anidados a partir del proceso de transgénesis y actividades humanas en donde puede haber traslape, dando pie a interacciones con peligros, riesgos e incertidumbres particulares, si se libera un OGM al ambiente y ésta entra a la cadena productiva y alimenticia. Los niveles anidados considerados son la construcción recombinante, genoma, fisiología, ambiente, mientras que las dinámicas humanas consideradas son agricultura, alimentación, cultura y economía.

peculiaridades de los niveles superiores, serán relevantes únicamente para los casos en los que se presenten las condiciones particulares asociadas a dicho contexto y riesgo/incertidumbre particular, surgido de un nivel superior.

Por ejemplo, las consecuencias de los maíces transgénicos en países para los cuales el maíz es el alimento básico, con la relevancia nutricional, ambiental, económica, social y cultural que esto conlleva, serán muy distintas a las que tendrán estos desarrollos en otros países donde no lo es. Por los riesgos e incertidumbres del uso de este tipo de organismos, así como por la percepción social de los mismos, en los países para los cuales el arroz (Este asiático) y el trigo (Estados Unidos de Norteamérica, Canadá y Europa) son los cereales básicos y se consumen masivamente de manera directa (como sucede con el maíz en México),

ha habido mucha resistencia a la liberación de líneas transgénicas de estos cultivos. En Canadá y Estados Unidos sólo 5 líneas de arroz GM han sido aprobadas para su liberación en el ambiente en espacios restringidos, mientras que 7 líneas de trigo GM han sido liberadas en el ambiente a nivel experimental en áreas muy pequeñas. Pero en ninguno de estos dos cereales básicos se ha aceptado la comercialización de líneas transgénicas a gran escala ([www.agbios.org](http://www.agbios.org)), como ha sucedido con el maíz. Por lo tanto, la protección de este último corresponde a México y a nuestro gobierno.

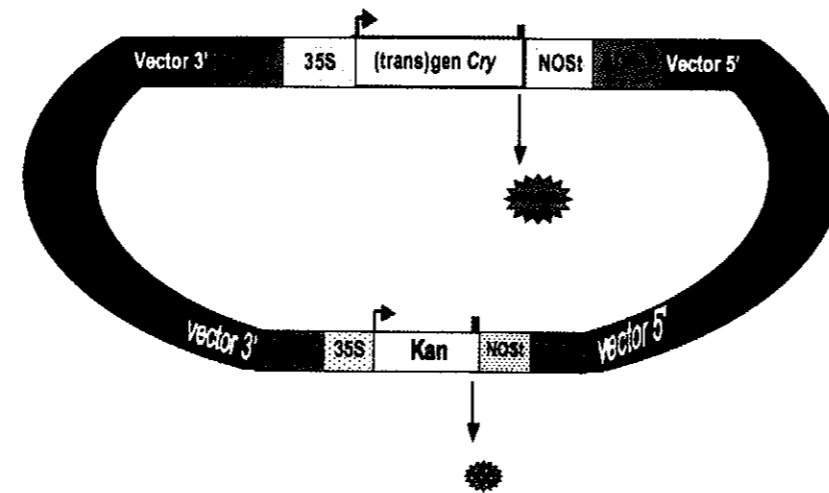
El análisis de los niveles de anidamiento es útil para discernir en qué punto de la cadena productiva puede haber riesgos o incertidumbres al usar tecnologías que no son claramente peligrosas. Tal es el caso de los maíces transgénicos de uso agrícola (conocidas popularmente como *Bt* y *RR*) comercializados hasta el momento. Sin embargo, hay desarrollos tecnológicos como los cultivos utilizados de "biorreactores", que implican peligros contundentes para la salud y el medio ambiente en prácticamente todos los niveles de anidamiento, sin importar la dinámica humana de los niveles superiores. En este caso, es imperativo reducir los riesgos en todos los niveles, por más pequeños que éstos sean (Ellstrand, 2003b; Editorial *Nature Biotechnology*, 2004). En este sentido, ya existen maíces transgénicos biorreactores, los cuales han sido genéticamente modificados para producir sustancias no aptas para consumo humano, como plásticos, solventes y fármacos (Ellstrand, 2003b).

### Construcciones recombinantes en maíz

#### *Genes incluidos en el cassette de transformación o construcción quimérica*

El primer nivel de anidamiento está dado por las secuencias génicas reguladoras presentes en la construcción quimérica en donde se encuentra fusionado el gen que codifica para la proteína objeto de la transgénesis. En la Figura 2 ilustramos una construcción que contiene uno de los desarrollos económicamente más importantes en maíz transgénico: el que expresa una variante de la proteína Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (llamado maíz *Bt*). La construcción recombinante contiene por lo menos tres secuencias: promotora, gen de interés y terminadora. Es pertinente considerar la función de cada una de las secuencias usadas: a) secuencia promotora que regula la expresión de un gen (gen *Bt*, en este ejemplo);

Figura 2.



Caricatura de un plásmido de transformación hipotético (vector), que lleva dos construcciones recombinantes: una que expresa el gen *Cry* de *Bacillus thuringiensis*, que es el transgen de interés (caja blanca; proteína-estrella en gris), y otra construcción que expresa el antibiótico Kanamicina (Kan), utilizado como marcador de selección (caja gris claro; proteína-estrella gris con puntos blancos). Ambas construcciones tienen secuencias que no serán traducidas a proteína: Cajas negras: extremos 3' y 5' del vector (plásmido); cajas grises: ADN de transferencia (ADN-t); éste se encuentra presente si la transformación fue mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens*. Cajas con puntos: secuencias reguladoras. Lado izquierdo: promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (35S); lado derecho: terminador NOS, nopalina sintetasa, aislado de *Escherichia coli* (NOS); flecha: inicio de la transcripción; rectángulo negro; fin de la transcripción.

b) (trans)gen de interés: codifica para la proteína que se quiere producir en un organismo genéticamente modificado; c) secuencia terminadora de la transcripción del mismo gen, que delimita hasta dónde llega la ADN polimerasa; d) secuencia utilizada como marcador de selección: sirve para determinar qué plantas han sido transformadas exitosamente —hasta ahora la estrategia más utilizada ha sido la co-transformación con genes que expresan una proteína que confiere resistencia a un antibiótico, en particular la kanamicina y otros de la familia de las penicilinas, o resistencia a herbicidas, así como otras sustancias (ver Capítulo 3); y e) secuencias flanqueadoras de la construcción recombinante que pueden

aumentar las posibilidades de inserción exitosa en el genoma receptor. Todas las secuencias enlistadas, salvo la b), no son objeto directo del desarrollo biotecnológico, sin embargo, son integradas en el genoma de la planta receptora e implican peligros y riesgos importantes que consideramos en este apartado.

#### *El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV)*

Esta secuencia promotora es una secuencia reguladora de la expresión de un gen que provoca una expresión fuerte y constante del gen bajo su acción. Es una secuencia originalmente aislada de un virus que provoca la enfermedad del mosaico en la coliflor (Guilley *et al.*, 1982). En un inicio se creía que sólo funcionaba en plantas dicotiledóneas como la coliflor (de la familia Brassicaceae) en la cual fue aislada y caracterizada a partir del virus del mosaico. Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que este promotor podía ser funcional en otras plantas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, en bacterias como *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizogenes*, y en células humanas (ver citas en Steinbrecher, 2002).

Debido a su eficiente y alta expresión en todo tipo de tejidos durante todas las etapas del desarrollo de las plantas (expresión ectópica y constitutiva), ha sido el promotor más utilizado en la transformación genética de plantas. En el caso del maíz, el promotor CaMV 35S ha sido utilizado en más de 85% de los tipos de maíz transgénico liberados en el ambiente y muchos de ellos comercializados en diferentes partes del mundo ([www.agbios.org](http://www.agbios.org)).

La primera incertidumbre y los riesgos potenciales a nivel de las construcciones recombinantes que incluyen este promotor surgen justamente del hecho de que es un promotor de origen viral y los virus nunca transfieren sus secuencias promotoras al genoma de las plantas o animales que infectan (Guilley *et al.*, 1982). Este hecho es relevante por varios motivos. Por un lado, este promotor ha sido progresivamente modificado en el laboratorio para expresarse de manera constitutiva e independiente del contexto genómico en que se encuentre, fenómeno que se ha corroborado en diferentes organismos, incluidas células humanas en suspensión (Myhre *et al.*, 2006). También se ha documentado que puede activar y dirigir la expresión de genes que estén río abajo del sitio de inserción de la construcción transgénica que lo contiene; estos pueden

entonces ser genes endógenos o propios del organismo transformado genéticamente y no sólo los genes de la construcción transgénica.

Además, dentro de los genes presentes en el genoma de muchos seres vivos, incluidos plantas y humanos, se encuentran secuencias originarias de virus, mismas que podrían ser activadas por un promotor CaMV 35S. En el caso del ser humano esto sería mucho más difícil pues involucraría la transferencia de genes exógenos mediante técnicas como las utilizadas en terapia génica, o por algún otro mecanismo de transferencia horizontal. Pero en el caso de las plantas, se han documentado casos en donde el promotor 35S CaMV ha activado ectópicamente a un gen endógeno, o ha silenciado los propios transgenes que dirige u otros genes de la planta receptora (Kapoor *et al.*, 2005).

Por otro lado, la presencia de esta secuencia en el genoma de un organismo puede ser un factor intrínsecamente desestabilizador, ya que contiene secuencias que han sido caracterizadas como *hot-spots* de recombinación, regiones que favorecen la unión al ADN de enzimas como las recombinasas, las cuales a su vez pueden cortar y pegar el ADN de manera aleatoria. Esto ha sido comprobado en virus, pero existe la posibilidad de que lo mismo ocurra cuando este promotor es insertado en otros genomas (Kohli *et al.*, 1999). Es un hecho que no ha recibido la suficiente atención científica.

Algunos de los desarrollos comercializados en los últimos 5 años han comenzado a utilizar otros promotores, como el de la ubiquitina y zeína del maíz y arroz, los cuales se expresan de manera más específica, tanto temporal como espacialmente dentro de una planta. Sin embargo, el promotor CaMV 35S sigue siendo el más utilizado en los cultivos disponibles comercialmente.

### Contexto genómico

Existen aún muchas incógnitas en torno a la estructura, dinámica y regulación del genoma, pues éste no funciona de manera constante ni es estable, sino que es regulado por una red de señales recibidas tanto del ambiente externo como del interno. La integración de ADN foráneo dentro de un genoma establecido puede ocasionar efectos colaterales no previstos.

Las técnicas de ingeniería genética han sido presentadas como una gran herramienta por su exacta y previsible producción de organismos

genéticamente modificados. Sin embargo, el cambio inducido por la expresión de un (trans)gen en un OGM no es a menudo una simple cuestión de transcripción o traducción de la secuencia de ADN recombinante insertada.

Los métodos disponibles para transferir construcciones genéticas a las células son hoy día ineficientes e imprecisos. Actualmente se han desarrollado sistemas de transformación mucho más precisos que utilizan a nucleasas con dedos de zinc para insertar transgenes en sitios específicos del genoma (Shukla *et al.*, 2009). Sin embargo, los métodos utilizados en los cultivos transgénicos comercializados en la actualidad no permiten predeterminar el sitio de inserción del transgén en la célula/ADN receptor. Por tanto, es importante mencionar que dicha localización del inserto puede influir sustancialmente en la función del ADN integrado y producir efectos desconocidos sobre los propios genes del receptor. Como un ejemplo de lo antes mencionado, ya se han encontrado en un mismo cultivo de células de mamífero transfectadas, células con características diferentes (Recillas-Targa F., 2006; D' Aiuto L. *et al.*, 2006).

En principio, dadas las técnicas de transgénesis actuales, un número indefinido de variantes son producidas en cada evento de transformación. Estas variantes tienen sitios diversos de inserción y un número variable de copias completas o parciales de ADN insertas. Adicionalmente, versiones aberrantes como vectores truncados o rearrreglados pueden influenciar la integridad y funciones del genoma receptor. Estos efectos no pueden ser predichos y pasan desapercibidos en las pruebas convencionales (Filipecki y Malepszy, 2006; Latham *et al.*, 2006).

Por otra parte, los impactos producto de inserciones no caracterizadas no pueden predecirse a partir de inserciones ya identificadas. A todo esto, no debe olvidarse que aun cuando dos construcciones genéticas sean idénticas y estén ya "caracterizadas", no es factible extrapolar ninguna conclusión de bioseguridad a partir de un solo evento; por ejemplo, si se tienen dos líneas de maíz transgénico tratados con el mismo vector, no se puede extrapolar a partir de la observación del resultado en una de ellas, pues los sitios de inserción son diferentes y obviamente el contexto genómico del inserto también, lo que ocasiona que los genes afectados directa o indirectamente puedan influir en el fenotipo de la planta.

Hay que tomar en cuenta también que el producto de un transgén puede variar en sus propiedades, o bien que la integración de ADN foráneo puede ser fuente indirecta de nuevos ARN y proteínas recombinantes (Rang *et al.*, 2005).

Existe una serie de posibles consecuencias impredecibles producto de la inserción de ADN foráneo en una célula u organismo; dichas consecuencias pueden afectar de manera relevante alguna de las siguientes categorías:

- la integridad y función del genoma receptor (desestabilización del genoma);
- los procesos de control de expresión de genes (cambios en los niveles de expresión);
- el surgimiento de nuevos productos génicos y la variación en las propiedades del producto transgénico;
- las variaciones en el fenotipo;
- la producción de nuevos ARN y proteínas recombinantes;
- los cambios en la estructura cromatínica, en la topografía de proteínas de anclaje al ADN, en los patrones de metilación del ADN, metilaciones *de novo* de transgenes o extensión de patrones de metilación de transgenes a genes endógenos (efectos epigenéticos);
- la introducción de nuevos elementos reguladores como promotores, activadores, inhibidores, codones de inicio, terminadores, etcétera;
- la activación de elementos endógenos móviles con efectos colaterales como reinserciones a nuevos *loci*, transferencia genética horizontal, cambios en los productos génicos y silenciamiento/sobreexpresión de genes;
- las expresiones alteradas de un gran número de los propios genes del organismo receptor;
- la alteración de variables geográficas, químicas y ecológicas del medio ambiente (por ejemplo, xenobióticos);
- la transferencia de la secuencia del vector dentro de los cromosomas del organismo y la transferencia genética vertical y horizontal a otros organismos.

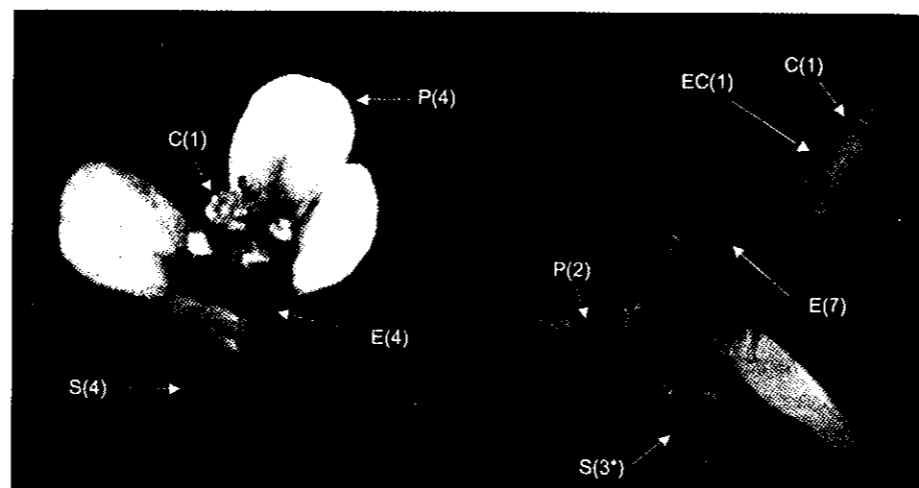
A continuación se analizan en detalle los riesgos derivados de la presencia de secuencias reguladoras que funcionan de manera autónoma —y comúnmente ectópica— con respecto al contexto genómico en que se insertan. Tal es el caso del promotor 35S CaMV. También están los riesgos derivados de que una construcción transgénica se fragmente al ser introducida a una planta. Esto último es bastante común cuando se

usan métodos de transformación por medios físicos como la biobalística, que es ampliamente usada en la transformación de maíz y otras monocotiledóneas que eran históricamente recalcitrantes a la transformación *in planta* mediada por la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, que debe ser previamente modificada para que lleve la construcción recombinante en su plásmido. En caso de fragmentación, las secuencias exógenas se quedan dispersas dentro del genoma receptor y pueden interferir con la expresión de un gen si son insertadas en su secuencia codificante. Esto anularía la expresión de un gen funcional. Otra posibilidad es una afectación a nivel epigenético, lo cual sucede cuando los fragmentos de la construcción recombinante son secuencias reguladoras (promotores u otros *enhancers* o potenciadores) que están lo suficientemente cerca de un gen endógeno como para modificar su expresión.

Otro riesgo relacionado con los anteriores, que surge en el nivel del genoma de la planta receptora, se desprende del hecho de que el efecto de un gen en el fenotipo (conjunto de rasgos fisiológicos o morfológicos de un ser vivo) depende del contexto genómico en el cual se encuentra dicho gen. En el caso específico de los transgenes usamos un ejemplo para ilustrar cómo el sitio de inserción de una construcción recombinante puede afectar el fenotipo. En la Figura 3 se muestran dos plantas gemelas, idénticas genéticamente, que sólo difieren entre sí en la localización del transgén insertado. En este caso se trata de una construcción que incluye el promotor 35S CaMV, un gen de la familia MADS, un terminador de la transcripción NOS, (gen de la nopalina-sintetasa, aislado de *E. coli*), un gen de resistencia al antibiótico Kanamicina, y secuencias que flanquean la construcción transgénica derivadas de *A. tumefaciens*, que permiten la inserción de la construcción recombinante en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Estos experimentos se realizaron bajo estrictas condiciones de bioseguridad en un laboratorio biocontenido, en una especie experimental que no crece en nuestro país, con el fin de entender cómo son y cómo funcionan las redes genéticas que regulan el desarrollo vegetal.

Como se ve en la Figura 3, lo sorprendente es que a pesar de que las plantas transformadas son todas gemelas idénticas, porque *Arabidopsis thaliana* se autofecunda, algunas son de apariencia silvestre (a) y otras no (b). Este hecho resulta de la imposibilidad de controlar el sitio de inserción de un transgén y del efecto que tiene sobre éste mismo el contexto genómico en que se inserta el transgén en el organismo receptor. En el caso de los OGM comerciales, en países como Estados Unidos

Figura 3



En el panel izquierdo se retrata una planta de *Arabidopsis* transgénica con apariencia igual a la de una planta silvestre. A la derecha, una planta hermana, producto del mismo evento de transformación, que presenta aberraciones morfológicas notorias. Ambas plantas fueron transformadas con la misma construcción y tienen el mismo fondo genético, por lo que lo único que varía entre ellas es el sitio de inserción de la construcción.

este hecho no tiene gran relevancia, pues las compañías seleccionan *a posteriori* las líneas con el fenotipo adecuado a sus fines, establecen líneas puras y de ellas distribuyen semillas para su venta, exigiendo a los agricultores que devuelvan los sobrantes y compren semilla nueva año con año.

Además, para un rango de condiciones parecidas a las usadas durante la selección *a posteriori* de las líneas transgénicas, éstas deben comportarse más o menos igual. Esto es cierto, y por ello los campos de maíz transgénico en Estados Unidos raramente muestran plantas aberrantes o con comportamientos extraños. Sin embargo, en el caso de México y de otros países en los que se encuentran variedades cultivadas y silvestres interfértiles con las transgénicas, el riesgo de efectos no deseados puede tener implicaciones mayores. En estas condiciones, los transgenes se introgresarán en el genoma de los nativos y acabarán en contextos genómicos diversos y muy distintos a los de los maíces usados en la transformación inicial. El riesgo de efectos inesperados

en generaciones posteriores dependerá de la probabilidad de flujo génico, que se discutió en el capítulo 3, y opera en el nivel del sistema agroecológico en que se usarán los transgénicos.

Otro riesgo a nivel genómico derivado de la transgénesis es el aumento en la labilidad e inestabilidad genómica del genoma receptor, al incrementar la potencialidad de recombinaciones ilegítimas o mutaciones espontáneas. Esto puede resultar del daño físico que es producido en el ADN del genoma receptor cuando se le introducen construcciones transgénicas por medios físicos, pero también podría suceder en la transformación por infección con *A. tumefaciens*. En el caso de la biobalística, se rompe la cubierta celular y nuclear, así como la integridad del ADN, debido a la introducción a alta velocidad de partículas de oro o tungsteno recubiertas con la construcción transgénica de interés. El ADN incorpora la construcción transgénica al ser reparado por la maquinaria subcelular endógena. Este tipo de efectos potenciales producto de la transgénesis ha sido advertido pero no se ha documentado rigurosamente.

Cuando se usa la biobalística, el o los sitios de rompimiento e introducción del transgén son aleatorios y deben ser reparados independientemente de si se incorpora la construcción transgénica completa, parcial o no, lo cual genera procesos de recombinación ilegítima al interior del genoma receptor. En cualquier caso, si la transgénesis genera mayores tasas de mutación o no, es algo que ha recibido muy poca atención y sin duda debería investigarse con mayor rigor antes de liberar una planta transgénica en el ambiente, sobre todo si dicha planta puede entrecruzarse con otras locales. Estas incógnitas no han sido investigadas para el caso de la posible introducción de maíz transgénico en México.

#### ¿Por qué ocurren rearrreglos en el ADN?

En las plantas, la transferencia de ADN exógeno provoca la activación de nucleasas y enzimas reparadoras de ADN para arreglar el daño producido por la transgénesis. El ADN transferido es degradado o usado como sustrato para dicha reparación, lo que da como resultado un reordenamiento y una incorporación potencial del ADN exógeno en el ADN genómico de la planta (Takano *et al.*, 1997). Además, la estructura específica del plásmido de transformación y las propiedades de la construcción transgénica pueden activar eventos de recombinación durante el proceso

de transformación; algunos elementos genéticos pueden actuar como *hot-spots*, es decir, sitios con alta frecuencia de recombinación, como es el caso del promotor 35S CaMV (Kohli, *et al.*, 1999).

La recombinación ilegítima también puede ocurrir en los bordes del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, especialmente en el borde derecho que contiene una secuencia palindrómica imperfecta de 11 pares de bases (pb). También el sitio 3' terminal del terminador NOS es potencialmente propenso a la recombinación (Kohli *et al.*, 1999). Los *hot-spots* de recombinación pueden llevar a que transgenes en tándem se repitan con secuencias intercaladas de ADN de plantas en un solo *locus* genético.

#### **Cambios en el transcriptoma**

La intención de todo proceso transgénico es obtener una planta donde el transgén de interés esté altamente expresado. El cambio necesario para que esto ocurra requiere la adición de un tipo nuevo de transcritos al transcriptoma del organismo que ha sido modificado genéticamente. Sin embargo, la falta inherente de precisión en el proceso de inserción puede llevar también a la expresión de transcritos adicionales no intencionados.

Las aberraciones en el transcriptoma de un OGM pueden ser de la siguientes formas:

- cambios cualitativos en los transcriptomas debido a secuencias terminadoras ineficientes en una variedad de planta transgénica;
- cambios cuantitativos en el transcriptoma debido a la influencia de secuencias regulatorias del transgén en genes endógenos localizados cerca o lejos del sitio de inserción.

#### *Ejemplo de nuevos transcritos in planta producto de la presencia de un transgén*

Existe nueva evidencia que sugiere que la secuencia del terminador NOS usada en un buen número de variedades de plantas transgénicas es un sitio de alta recombinación, propenso a ser leído por la ADN polimerasa y que puede contener una secuencia críptica de empalme en *cis*, la cual podría generar nuevas moléculas de ARN y proteínas en cualquier lugar del genoma (Rang *et al.*, 2005).

Ciertas variedades de soya Roundup Ready® (RR) tolerantes a glifosato han sido desarrolladas mediante la inserción de la proteína enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintetasa de la cepa CP4 de *E. coli* (EPSPS-CP4). La inserción transgénica y las regiones flanqueantes de la soya RR han sido recientemente caracterizadas molecularmente. Se reportó que fragmentos mayores a 250 pb del gen EPSPS-CP4 están localizados río abajo (extremo 3') del elemento de terminación de transcripción NOS, derivado del gen que codifica para la NOS en *A. tumefaciens*. Por lo menos 150 pb de esta región de ADN están transcritos en la variedad de soya RR. La transcripción del fragmento adicional depende del marco de lectura, es decir, si dichos eventos ignoran o no la señal del terminador NOS localizada río arriba. Los datos indican que el producto final de la lectura es una variante diferente de ARN en donde la región transcrita del terminador NOS es completamente borrada. Esta supresión genera marcos de lectura abiertos que podrían codificar para las proteínas de fusión EPSPS (Rang *et al.*, 2005).

El terminador NOS es usado como elemento regulador en muchas otras plantas transgénicas destinadas a la producción de alimento. Esto implica que tanto los productos codificados como la generación de nuevas variantes de transcritos de ARN podrían ser una característica común en tales plantas.

#### *Ejemplos de la actividad del promotor 35S CaMV en células de mamíferos*

En la mayoría de las plantas transgénicas comercializadas, la transcripción del transgén está regida por el promotor 35S CaMV. En 2001, Gasson y Burke reportaron sus preocupaciones (no fundamentadas experimentalmente) de que potentes promotores virales empleados en plantas para expresar ADN transgénico pudieran estar activos o ser activados en células de mamífero. Actualmente ya existen algunos estudios publicados que indican el potencial del promotor 35S CaMV para la activación transcripcional en sistemas mamíferos, además de estudios con diferentes especies de levaduras (Myhre *et al.*, 2006). Myhre y colaboradores demostraron la actividad del promotor 35S en cultivos de fibroblastos humanos y, a partir de entonces, en células de hámsters. También estudiaron la actividad del promotor 35S en células similares a enterocitos humanos, por ser relevantes en la absorción de ADN trans-



génico, y concluyeron que podría producir efectos no deseados en los hospederos si se consumiera de forma no intencional.

Estos datos ponen de manifiesto que muchos supuestos sobre la inocuidad de secuencias transgénicas, hechos en ausencia de investigación experimental, pueden ser bastante engañosos.

*Ejemplo de sobrerregulación de un gen endógeno bajo la influencia de un promotor transgénico*

La X-Scid es una enfermedad ligada a un gen defectuoso en el cromosoma X que conlleva el desequilibrio del sistema inmune debido a la falta de células T. Cualquier tipo de infección pone en riesgo la vida de quien presenta esta enfermedad (Allenspach *et al.*, 2003).

Con el fin de curar, o al menos aliviar, los síntomas de las víctimas de X-Scid se desarrolló un protocolo de terapia génica. Se tomaron células de médula ósea de 11 pacientes y se cultivaron *in vitro*. Las células fueron transfectadas con una copia sana del gen defectuoso mediante un vector y un promotor potente. Una vez controladas las células por la expresión del transgén, y al no presentar características no deseadas, fueron devueltas al paciente, esperando que la integración del gen sano incrementara la producción de células T, mejorando así la funcionalidad del sistema inmune. Sin embargo, uno de los pacientes tratados desarrolló un tipo de cáncer altamente agresivo, debido a que en sus células tratadas el vector de transferencia del gen se había integrado en un sitio próximo al gene *Lmo2* que codifica un producto proteínico conocido por ocasionar cáncer cuando se sobreexpresa; en este caso, el potente promotor empleado fue causa de dicha sobreexpresión (Hacein-Bey-Abin, *et al.*, 2003).

*¿La "transvección" ocurre durante la transgénesis en las células mamíferas?*

Una cuestión importante que necesita ser esclarecida es la potencial capacidad de motivos de ADN en una construcción transgénica, incluyendo las secuencias del plásmido vector, de actuar como activadores transcripcionales y, por consiguiente, influir en la transcripción de genes endógenos.

Los activadores transcripcionales son secuencias de ADN relativamente cortas (30-500 pb) y generalmente activas *in cis*, formadas por diversos motivos de unión a proteínas activadoras de factores de transcripción. Los *enhancers* (potenciadores) tienen una importante capacidad de comunicarse con los promotores, a menudo activando genes a larga distancia, además de que algunos de estos elementos transcripcionales son capaces de activar promotores que no están presentes en la hebra de ADN contigua al promotor transgénico (regulación *in trans*).

Estudios recientes realizados por D'Aiuto y colaboradores (2006) han demostrado que un activador del CMV (citomegalovirus humano) puede incrementar la actividad de su promotor *in trans* en ausencia de factores que conlleven una cercanía física al promotor. Un proceso como este es llamado *transvección*. Los autores proporcionaron evidencia de que este elemento de CMV puede también activar otros promotores en el genoma receptor (D'Aiuto *et al.*, 2006). Debido a que tales efectos de *trans*-activación pueden resultar en una activación transveccional no deseada o inesperada de genes endógenos, estos hallazgos son importantes para poder concebir un rango de efectos transcripcionales esperados en los planteamientos de la ingeniería genética y la terapia génica.

*Cambios en el proteoma*

Como ya se ha mencionado, la expresión de una proteína que confiere una propiedad o característica deseada es inherente a un OGM; hay diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de proteínas en una célula modificada a partir de la integración de ADN exógeno en ella. Los siguientes ejemplos ilustran las profundas e impredecibles diferencias en las funciones biológicas de una proteína recombinante cuando está siendo modificada post-traduccionalmente en el organismo receptor.

*Un gen inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ AI) transferido del frijol común al chícharo*

Recientemente se demostró que la expresión de una proteína vegetal recombinante ( $\alpha$ AI) del frijol común en plantas hospederas no nativas, como chícharos transgénicos, condujo a la síntesis de una estructura

modificada, probablemente alguna forma glucosilada aberrante de esa proteína.

En dicho estudio se reveló que el consumo de la áAI modificada produjo una respuesta inflamatoria tipo CD4+Th2 en ratones ante un antígeno específico; además, que el consumo simultáneo de otras proteínas podría desencadenar inmunorreactividad específica en estas proteínas normalmente no inmunogénicas. Esta investigación demostró que la expresión recombinante de proteínas no nativas en una planta puede conducir a la síntesis de variantes estructurales con inmunogenicidad alterada (Prescott *et al.*, 2005).

#### *Producción de proteína recombinante en leche*

En 2006, la Agencia de Medicina Europea (EMA) aprobó el primer fármaco en ser liberado al mercado producido a partir de un animal transgénico. El ingrediente activo ( $\alpha$ -antitrombina humana) es obtenido mediante purificación de la leche de cabras transgénicas y se usa para tratar pacientes que sufren de deficiencia hereditaria de antitrombina y que, por tanto, corren el riesgo de una trombosis. Comparado con la  $\alpha$ -antitrombina convencional, la vida media del suero de Atryn (el nombre comercial del fármaco producido por GTC Biotherapeutics) es reducida, por lo que es necesario su inyección en una única aplicación.

La principal preocupación de EMA era el potencial inmunogénico del Atryn; un problema adyacente es la dificultad para producir proteínas "idénticas" en leche de organismos transgénicos, ya que en el caso de vacas, cabras y ovejas, las proteínas glicosiladas contienen ácido N-glicolilneuramínico, una modificación ausente en proteínas humanas (Editorial, 2006).

#### *Cambios en el metaboloma*

Los efectos no intencionados de la transgénesis están muy relacionados con cambios en el metabolismo. En plantas, el metaboloma determina el sabor, el aroma y la textura, sus propiedades, valor nutricional y el desempeño en un cultivo. La ingeniería metabólica ha potenciado el mejoramiento de los cultivos; sin embargo, hay problemas inherentes relacionados con el hecho de que el metabolismo de un organismo forma una gran red interconectada.

Un importante número de cambios inesperados ha sido observado en estudios experimentales en *Arabidopsis thaliana*, maíz y en tomates. Asimismo, pruebas de campo con líneas de trigo transgénico han demostrado la influencia del ambiente tanto en el metaboloma de transgénicos como en el de variedades no modificadas (Romer *et al.*, 2000; Saxena y Stotzky, 2001; Hemm *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2006). También se han observado cambios en el perfil proteico (transcriptómico) de líneas de maíz transgénico con respecto a su aislón más cercana, aún en ambientes biocontenidos (invernaderos; Zolla *et al.*, 2008).

Por otra parte, el desarrollo de variedades de papas genéticamente modificadas ha sido útil para determinar la presencia de cambios en las cantidades y tipos de metabolitos secundarios tóxicos producidos por el tubérculo, como los sesquiterpenos y los glicoalcaloides. En 2005 fue publicado un estudio en donde líneas de papas transgénicas fueron expuestas junto con líneas no transgénicas a un rango de condiciones ambientales estresantes. Después del periodo de estrés al que se sometieron los cultivos, estos fueron comparados y se observaron diferencias significativas en los niveles de estos metabolitos (Matthews *et al.*, 2005).

#### *Cambios en el epigenoma*

Durante el proceso de transgénesis puede inducirse cambios epigenéticos en las células, y éstos ser heredados a las generaciones siguientes. Sin embargo, es difícil determinar si la impronta epigenética es resultado de la transgénesis o de las técnicas de regeneración celular.

El proceso de transgénesis puede promover mecanismos mutagénicos relacionados con el estrés. De acuerdo con Filipecki y Malebszy (2006), estos mecanismos conllevan probables cambios genéticos tales como poliploidía, aneuploidía, rearrreglos cromosomales, recombinación somática, amplificación de genes, mutaciones puntuales e inserciones de retrotransposones; también se pueden generar cambios epigenéticos, como metilación del ADN y modificaciones en las histonas.

La regulación de la expresión génica inducida por cambios en la metilación del ADN es un mecanismo regulador muy potente. La transgénesis puede inducir cambios en la metilación en dos direcciones:

- hipometilación del ADN, dando lugar a activación de genes e inestabilidad cromosómica;

—hipermetilación del ADN, llevando consigo silenciamiento de genes, reestructuración cromatínica y silenciamiento de RNA asociado.

En 1996, Matzke y Matzke reportaron cambios por hipometilación en plantas recombinantes, demostrando que pueden surgir diferentes estados de expresión epigenética en plantas transgénicas regeneradas a partir del mismo material y que estos estados son heredados a las siguientes generaciones. A su vez, el silenciamiento de transgenes en gramíneas y otras monocotiledóneas ha sido documentado desde los primeros experimentos transgénicos (Lakshminarayan *et al.*, 2000).

#### *Cambios en el interactoma*

Los conceptos y tecnologías de la biología molecular clásica han dominado los enfoques de la ingeniería genética durante los últimos 50 años, favoreciendo el desarrollo de métodos que permiten el entendimiento de procesos complejos mediante la separación, purificación y seguimiento de algunas rutas y moléculas. Sin embargo, una característica fundamental de toda organización biológica es que sus unidades funcionales nunca están aisladas. La complejidad biológica está basada, precisamente, en la cooperación sinérgica lograda por las interacciones de los componentes de una célula (Álvarez-Buylla *et al.*, 2007).

Es sólo en raras ocasiones que la forma funcionalmente activa de una proteína es un monómero protéico, como a menudo se asume cuando se usan transgenes. El conocimiento de las interacciones en las proteínas es, por lo tanto, una fuente de información importante para comprender su funcionamiento y modelar procesos regulatorios a nivel del genoma.

El que una proteína transgénica provea una función deseada (por ejemplo: efectos insecticidas o tolerancia a herbicidas en plantas) no excluye que contenga dominios activos adicionales que se vuelvan evidentes en el nuevo contexto genómico, biológico y ambiental. Las proteínas recombinantes pueden dar lugar a formaciones complejas al unir a proteínas endógenas y otros elementos celulares cuando están presentes en nuevos ambientes, desencadenando la activación o inhibición de procesos celulares o incluso creando nuevos procesos intracelulares.

#### **Contexto fisiológico**

El cultivo de células manipuladas genéticamente para la obtención de productos recombinantes bajo condiciones de laboratorio puede parecer en principio una opción segura; sin embargo, cuando células u organismos transgénicos son liberados en el ambiente hay posibilidades de cambios en los niveles de expresión de genes y producción de metabolitos que podrían variar de acuerdo con las condiciones del entorno.

Las proporciones y cantidades de proteínas producidas por una planta transgénica en comparación con su aislónea no transgénica pueden verse trastornadas, llevando a la planta a producir más de cierto tipo de proteínas que de otras. Esto puede suceder en ciertas partes y momentos del desarrollo o en todos ellos. Esta posibilidad ha sido corroborada para un tipo de maíz transgénico (MON810), en donde estudios proteómicos demostraron que por los menos 100 proteínas estaban modificadas, mientras que 43 de estas 100 tenían aumentos o disminuciones significativas frente al perfil proteico de una planta no transgénica con el mismo fondo genético que la MON810 y cultivada bajo las mismas condiciones controladas que las plantas transgénicas (Zolla *et al.*, 2008). Este estudio fundamenta la necesidad de poner a prueba las modificaciones fisiológicas de las plantas transgénicas a niveles más finos que las hechas hasta ahora. Estas investigaciones deben abarcar otras sustancias además de las producidas por el transgén de interés.

En otro estudio menos exhaustivo se observó que la cantidad de lignina producida por una planta transgénica (MON810) aumentaba significativamente en comparación con su contraparte no transgénica (Saxena y Stotzky, 2001). Estos dos estudios ponen de manifiesto que en ciertos contextos fisiológicos la transgénesis puede modificar por lo menos la proporción y cantidad de proteínas totales producidas como consecuencia no deliberada de la transgénesis. Si bien estos cambios pueden conferir ventajas adaptativas a las plantas que las poseen, también podrían ser en su detrimento; por ejemplo, cabe la posibilidad de que se produzcan compuestos tóxicos o alergénicos, y en el caso de conferir ventajas adaptativas, si además expresan fármacos u otras sustancias no aptas para el consumo (es decir, son bio-reactores), la ventaja adaptativa implicaría un mayor riesgo de expansión y contaminación no deseada y difícil de controlar.

Tampoco se sabe qué efectos e interacciones se verán cuando se acumulen varios transgenes en una misma planta. Esto también es

plausible en condiciones como las de México, en donde se puede dar la polinización cruzada repetida con varias líneas transgénicas distintas.

### Escala agroecológica

Los riesgos, incertidumbres y peligros más relevantes a consecuencia de liberar maíz transgénico en el ambiente más relevantes son aquellos que surgen en el nivel agroecológico, relacionados con el hecho de que México es centro de origen y diversificación del maíz (*Zea mays* ssp. *mays*), así como de diferentes tipos de teocintles con los que se puede entrecruzar (en especies de teocintle como *Zea mays* ssp. *parviglumis*, dicha tasa de hibridación puede alcanzar frecuencias de hasta 50%). Los estudios paleontológicos han fechado las primeras mazorcas de maíz, descubiertas en una cueva del valle de Tehuacán, en los estados de Puebla y Oaxaca, entre aproximadamente 10,000 y 13,000 años antes del presente (Benz, 2001).

Los estudios genéticos realizados mediante cruza controlada entre maíz y su pariente más cercano, una subespecie de teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*), han ayudado a discernir los cambios genéticos que subyacen a las grandes diferencias morfológicas entre la mazorca del maíz y la infrutescencia del teocintle (Doebley *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005; Figura 4). Estas diferencias son grandes a nivel del fenotipo, pero pequeñas a nivel genético (involucran, hasta donde se sabe, unos cuantos genes homeóticos). Dicha evidencia nos sirve para insistir en la no linealidad de la relación entre el genotipo y el fenotipo, y la posibilidad de que (como se muestra en la Figura 3) algunas alteraciones genéticas o epigenéticas pequeñas producidas por la transgénesis puedan tener efectos fenotípicos grandes e inesperados dependiendo del contexto genómico en el que se inserte el transgén.

Actualmente, el mejoramiento agronómico campesino ha generado por lo menos 50 razas de maíz, con características morfológicas, agrícolas y bioclimáticas particulares. Dada esta diversidad, es fundamental documentar no sólo los centros de origen, sino también los de diversificación del maíz. Éstos, más que los mismos centros de origen, acumulan probablemente la mayor parte de la diversidad genética del maíz, como ha sido documentado para el caso de otro cultivar mesoamericano: el aguacate. En el caso del maíz, en los acervos de México se resguarda más de 60% de la variación genética de todo el mundo. Por

lo tanto, nuestro país es también el centro de diversidad de este cereal (Ver capítulos 1 y 3).

El maíz es además una planta de polinización abierta y muy promiscua. Más de 90% de las semillas de una mazorca son resultado de la fertilización de los óvulos por polen proveniente de otras plantas. La probabilidad de flujo vía polen y la distancia a la cual viaja dependen de las condiciones agroecológicas. Las plantas de maíz transgénico podrán polinizar a plantas de maíz no transgénico aunque no estén en parcelas contiguas. De esto ya se habló en el capítulo 4 de este expediente; por ello, no se abordará en detalle aquí. Sin embargo, es importante recordar que el riesgo de polinización cruzada entre ambos tipos de plantas dependerá de muchos factores prácticamente imposibles de controlar. Entre estos factores están la distancia entre las parcelas, la sincronía en los tiempos de floración de ambos tipos de plantas, la dirección de las corrientes de viento, la humedad relativa del aire, la temperatura y la orografía, todos los cuales pueden aumentar los riesgos de flujo de transgenes vía polen. El documentar el flujo génico en el campo es técnicamente complicado y demandante y todavía no existe un consenso sobre cómo hacerlo.

Dado el número limitado de semillas seleccionadas para cada ciclo agrícola, es posible que un transgén se fije incluso por un fenómeno conocido en la genética de poblaciones como "cuello de botella" o deriva génica, donde, de la variación contenida en todas las semillas de una población, muy poca estará presente en la siguiente generación, pues de manera azarosa algunas variantes se excluyen en la muestra pequeña de semillas que se usan en cada ciclo agrícola. Por ejemplo, si en un costal tenemos frijoles negros y blancos en partes iguales, y sacamos a ciegas sólo 5, todos ellos podrían ser de un solo color, o en vez de tener 50% de cada uno como en la "población" original, podríamos tener diferentes proporciones. Por lo tanto, el manejo campesino tradicional puede ser un mecanismo que favorezca la fijación de transgenes en razas nativas siempre de manera azarosa y aún en casos en los que estos no confieren ventajas a los cultivos.

Adicionalmente, en el proceso de distribución de semilla se pueden mezclar involuntariamente semillas transgénicas con no transgénicas. Por ejemplo, durante su transportación a granel en contenedores que no están sellados totalmente o en vehículos de transporte terrestre o ferrocarril, al escaparse semillas durante su trayecto a lugares de almacenamiento. Dichas semillas pueden germinar cerca de parcelas de maíz no transgénicas y entrecruzarse con plantas de éstas. Al llegar a los sitios

de almacenamiento pueden mezclarse durante su empaquetamiento o cuando las bolsas o costales de semillas transgénicas se rompen y se mezclan con semillas no transgénicas guardadas en almacenes comunes. También, el uso de la misma maquinaria para manejar ambos tipos de semilla puede favorecer su mezcla a bajas frecuencias si ésta no es correctamente limpiada.

Si bien todos estos pasos involucrados en la distribución de semilla podrían teóricamente controlarse mediante el uso de contenedores sellados durante el transporte de semilla transgénica, el uso de almacenes exclusivos, criterios más rigurosos para el manejo de semilla cuya identidad es dudosa (destrucción), la limpieza de la maquinaria, los contenedores y el transporte utilizados, así como informar al agricultor de la posible presencia de semilla transgénica no distinguible visualmente de la no transgénica, la segregación total es imposible. Este es el caso aun en países como Estados Unidos, en donde el abasto de semillas es controlado por las compañías semilleras y existen regulaciones estrictas. En este país, más del 50% de los acervos de semillas de maíz, soya y canola que no deberían tener transgenes están contaminados con más de 1% de los mismos (Mellon y Rissler, 2004). Además, existen varios casos concretos que ejemplifican la imposibilidad de segregar, aun cuando se vigila que esto no suceda. Tal es el caso del escape de maíz *Starlink*, que produce una variedad de la proteína Cry (9c) de *Bacillus thuringiensis* que, por sus posibles efectos alergénicos al hombre, fue aprobada sólo para consumo animal. De manera inadvertida, esta proteína llegó a diversos productos alimenticios presentes en los anaqueles de los supermercados en Estados Unidos (Netting, 2000).

En Estados Unidos tampoco se ha podido contener al 100% las siembras experimentales de OGM que expresan fármacos o sustancias industriales, las cuales están sujetas a medidas de regulación y contención mucho más estrictas que los otros tipos de transgénicos. Dos casos de ello son: la contaminación en 2002 de la maquinaria y la posible cruza con otros maíces, de un maíz transgénico creado por ProdiGene que expresaba una vacuna para puercos (News Nature, 2007); y el escape reciente, en 2006, de una línea de Bayer de arroz Liberty Link (evento LL601), sembrado a nivel experimental en Estados Unidos y que inadvertidamente llegó al arroz destinado para exportación a Japón (News Nature, 2007). Más tarde se detectó en arroces de anaquel en muchos países del mundo. En México, el INE publicó en los periódicos que cerca de 90% de los paquetes de arroz en los supermercados estaban conta-

minados con esta variedad aún no autorizada para consumo humano. Esta situación es grave si pensamos que 70% del arroz que se consume en México proviene de Estados Unidos (Más adelante se discute con detalle la problemática de los maíces bioreactores que producen este tipo de sustancias industriales).

Al peligro de disrupción de los acervos genéticos *per se*, que puede tener consecuencias muy negativas para futuros planes de mejoramiento agronómico o para la seguridad alimentaria nacional e internacional, se le deben sumar los posibles efectos ecológicos no deseados. Entre ellos —ya discutidos ampliamente en otras contribuciones— se cuenta la posible aparición de insectos resistentes a las proteínas insecticidas de la variedades de maíz *Bt* comercializadas actualmente y la evolución de supermalezas tolerantes a los herbicidas que se tendrán que administrar, en cantidades cada vez mayores, al maíz transgénico tolerante a estos agrotóxicos. Esto ya es una realidad en países como Estados Unidos y Argentina (para ver lista de malezas resistentes, consultar: <http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOA.asp?lstMOAID=12>). Además, existe el riesgo de acumulación del glifosato en el ambiente, el daño o efecto nocivo a organismos no blanco y sus efectos multiplicativos y difíciles de predecir en los ecosistemas, la persistencia de los transgenes en variedades nativas o silvestres, y la acumulación de proteínas recombinantes en el suelo, con posibles efectos nocivos, entre otros. Algunos de estos puntos se desarrollarán más adelante.

### Biorreactores vs. alimentos

Hasta el momento se han abordado los riesgos, incertidumbres y peligros de las líneas de maíz comercializadas actualmente, en las cuales los riesgos a la salud no son aparentes. Sin embargo, los estudios sobre los efectos en la salud se han hecho con base en el principio de equivalencia substancial que ha sido ampliamente criticado en Europa, el cual establece que una planta transgénica y otra no transgénica son iguales, y sólo difieren en la proteína producida en la primera (Millstone *et al.*, 1999). De tal manera que los efectos en la salud provocados por las plantas transgénicas generalmente son analizados limitando los estudios a los efectos de dichas proteínas recombinantes purificadas y aisladas del contexto de la planta en donde se producen. Es imperativo promover estudios sistemáticos usando, a lo largo de varias generaciones de

animales de laboratorio, las plantas transgénicas como tales. Algunos estudios independientes han alertado sobre ciertos efectos nocivos que no han sido ampliamente investigados en diferentes organismos (por ejemplo: Spiroux de Vendomois *et al.*, 2009).

En los últimos años, la tecnología de bioprocesos está teniendo un desarrollo vertiginoso, y el énfasis en el uso de la biotecnología de ADN recombinante está pasando de estar enfocada a proveer de insumos a la agricultura industrializada al uso de seres vivos o partes de ellos para la producción industrial de diversas sustancias no comestibles. Muchos procesos que antes se realizaban en reactores químicos ahora se llevan a cabo en células y organismos vivos. Enzimas y otras proteínas que facilitan procesos químicos o biológicos se producen ahora mediante técnicas industriales de ADN recombinante. Las enzimas son fundamentales para la producción de detergentes, textiles, productos derivados de la madera y el papel, y combustibles. Ahora también se está considerando la posibilidad de que las plantas se puedan modificar para la producción renovable de materias primas para lograr desarrollos en salud, energía, industria química y materiales industriales.

Debido a que las plantas pueden convertir la energía solar en energía química a un bajo costo en relación con el requerido para producir compuestos químicos y farmacéuticos en una fábrica, se han generado plantas transgénicas que sintetizan medicamentos farmacéuticos, vacunas, anticuerpos, reactivos para la investigación y químicos industriales. Otras ventajas de la producción de estos compuestos a partir de las plantas transgénicas, en relación con sus fuentes originales, son: que su rendimiento puede ser mayor, los problemas de disponibilidad se minimizan en aquellos casos en que sean difíciles de obtener y, en otros casos, su calidad puede ser superior.

Ciertamente, el desarrollo industrial basado en bioprocesos, como el uso de enzimas biológicas, plantea algunas alternativas más sustentables para la industria; sin embargo, el uso de plantas a campo abierto para estos fines implica riesgos importantes, sobre todo cuando se trata de plantas alimenticias. El mayor riesgo de usar plantas transgénicas para los fines anteriores es que cuando se usan plantas normalmente aptas para la alimentación humana se corre el grave riesgo de contaminar la cadena alimentaria, lo cual puede afectar a los consumidores, ya sean humanos, fauna doméstica o silvestre.

Hace 15 años se introdujeron las primeras plantas que producían sustancias farmacéuticas, experimentales e industriales. Algunos

ejemplos de estas sustancias son: colorantes, pinturas, detergentes, jabones, adhesivos, lubricantes, biopolímeros o plásticos y materiales estructurales. Los mercados para algunas de estas materias primas son de billones de dólares (por ejemplo, 5.1 para lubricantes, 14.6 para materiales compuestos, 43 para pintura y 77 para plásticos). El usar plantas alimenticias para la producción de tales sustancias implica un riesgo económico mayúsculo, ya que el área cultivable avocada a la producción de alimentos puede ser desplazada por siembras de plantas para producir sustancias industriales.

Entre las compañías que manufacturan compuestos a partir de plantas transgénicas se encuentran *ProdiGene* (aprotinina, avidina y tripsina), *Large Scale Biology* (aprotinina) y *Ventria Biosciences* (lactoferrina y lisozima). Sus productos están a la venta en el catálogo de reactivos de laboratorio de *Sigma Chemical Company*. Es preocupante el hecho de que la producción de estas moléculas se haga en plantas alimenticias. Para la producción de aprotinina, avidina y tripsina se eligieron los granos del maíz (*ProdiGene*). Para lactoferrina y lisozima, el arroz (*Ventria Biosciences*), mientras que para la aprotinina (*Large Scale Biology*) se escogió el tabaco.

Las líneas de maíz transgénico que han sido modificadas para producir de manera endógena sustancias industriales que son tóxicas para animales y humanos (fármacos como anticoagulantes, vacunas y otras) cancelan el uso del maíz como planta alimenticia (como los que producen plásticos), por lo que representan un peligro irrefutable para la cadena productiva y alimentaria de maíz. Dado este peligro, una parte significativa de la comunidad científica ha externado su rechazo al uso de plantas comestibles como biorreactores. En México, dentro de la LBOGM, así como en los reglamentos emanados de la misma, se ha establecido explícitamente que este tipo de desarrollos en maíz no será permitido en el territorio nacional. Sin embargo, en Estados Unidos se han sembrado más de 77,531.35 hectáreas a campo abierto de este tipo de cultivos, los cuales incluyen una larga lista de sustancias farmacéuticas, de uso industrial y experimental no explicitadas por prerrogativa de secreto industrial. Si bien estos campos están sujetos a controles más estrictos de bioseguridad que los de transgénicos para uso agrícola, ya han existido casos de escape—como se verá abajo—, y mezcla de este tipo de cultivos biorreactores con cultivos convencionales o con cultivos transgénicos no tóxicos. Existe un riesgo inminente de escape o este puede ya haber ocurrido en Estados Unidos (para un reporte al respecto, ver Andow *et al.*, 2004).

Debido a este riesgo, es urgente impedir en todo el mundo el uso de especies de plantas alimenticias para generar biorreactores. En el caso de México es particularmente preocupante. Dadas las condiciones productivas y de consumo de maíz en México —este cereal se produce en todo el territorio, hay un flujo de genes importante a largas distancias dado el flujo de semillas, y es consumido en grandes cantidades por un amplio sector de la población, de manera cotidiana, sostenida y, en muchos casos, con un nivel bajo o nulo de procesamiento—, una mínima infiltración de estas líneas de maíz biorreactor podría multiplicarse en cada paso de la cadena productiva y alimentaria de maíz en México.

Dado que en Estados Unidos no se está haciendo un escrutinio cuidadoso de los transgenes en sus acervos y que a México entran más de 10.2 millones de toneladas de este grano sin que se exija (como lo hace Japón para su cereal básico, que es el arroz) que esté etiquetado y segregado, la posibilidad de contaminación por alguno de los genes que expresan estas sustancias farmacéuticas o industriales es un riesgo latente que no se está monitoreando y mucho menos previniendo.

A la fecha, es paradójico que, además de todos los riesgos implicados en su producción, y que no es más barato producirlos en cultivos de plantas transgénicas bioreactoras que de manera convencional, no se hayan prohibido en todo el mundo. El caso más exagerado es el de la avidina, que era 110 veces más costosa en el año 2006 si era de maíz que si era de huevo (catálogo Sigma-Aldrich 2006-2007). En 2012 su costo es del doble si es de maíz que si es de clara de huevo (catálogo Sigma-Aldrich 2012). Debido a su peligrosidad, enfoquémonos en la producción de avidina en los granos de maíz. La avidina es una proteína normalmente presente en la clara del huevo de pollo en una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Esta proteína tiene la propiedad de unir muy fuertemente a la biotina con una de las constantes de disociación más bajas que se conocen [ $K_a = 10\text{-}15 \text{ M}$ ] (Livnah, 1993).

Los primeros maíces transgénicos, obtenidos en 1995, contenían menos de 50  $\mu\text{g}/\text{g}$  de grano de avidina. Seis años después, en 2001, se obtuvieron maíces transgénicos con 10 mg avidina/g de grano (Howard, 2005). Un estudio demostró que los granos de maíz transgénico productores de avidina fueron tóxicos para los insectos, pero no para los ratones, cuando la concentración de avidina en el grano se encontraba entre 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{g}$ , por lo que se sugirió su uso como “insecticida” (Kramer *et al.*, 2000). Sin embargo, estas concentraciones se aproximan

a las de la avidina en la clara de huevo (500  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) por lo que se podría esperar que, a largo plazo, tuviesen efectos negativos aun en vertebrados. Es urgente realizar estudios sobre los efectos en mamíferos de los granos de maíz transgénico con concentraciones de avidina del orden de 10 mg avidina/g de grano, que pueden ser más tóxicas.

¿Qué efectos tiene el consumo de granos de maíz productores de aprotinina, un inhibidor de proteasas de serina, o de la tripsina, una proteasa? La aprotinina se ha usado como agente antihemorrágico durante la cirugía de *by-pass* de arterias coronarias, y se ha visto que aumenta el riesgo de muerte postoperatoria a largo plazo, además de causar serios problemas de toxicidad renal e isquemia durante la cirugía (Mangano *et al.*, 2007). Además, otro estudio demostró que cuando se alimentan abejas con polen al que se ha agregado aprotinina (0.25 mg/g), éstas mueren prematuramente (Malone *et al.*, 2001). La tripsina es una enzima que normalmente ayuda al proceso digestivo, sin embargo esto no debe impedir que se hagan estudios sobre los efectos del consumo de granos de maíz con altas concentraciones de la enzima. La lactoferrina es una proteína con alta afinidad por el hierro, con propiedades antimicrobiana y antiinflamatoria (Conneely, 2001). No existen informes en la literatura acerca de los efectos de su ingestión vía plantas transgénicas.

En 2005 se llevaron a cabo pruebas clínicas de fase I o II para al menos otros 30 productos farmacéuticos producidos en plantas transgénicas (Ma *et al.*, 2005). Destacan las vacunas, como la toxina estable al calor de *E. coli* (diarrea), la HbsAg (hepatitis B), la proteína de la cápside del virus Norwalk (diarrea) y la glicoproteína de la rabia; los anticuerpos, como LSBC scFVs (contra el linfoma que no es de Hodgkin), la avicidina (cáncer colorrectal), caroRX (caries dental); y otros productos como la lipasa gástrica (fibrosis quística y pancreatitis) y el factor intrínseco humano (deficiencia de vitamina B12). Las plantas en las que se están produciendo son el maíz, la papa, la lechuga, la espinaca, *Arabidopsis* y el tabaco (Ma *et al.*, 2005). Exceptuando a *Arabidopsis*, todas éstas son plantas de consumo humano habitual.

Si bien se podría vislumbrar que en el futuro este tipo de tecnologías podrían reducir los costos de estos productos al consumidor, no deja de ser peligroso que primordialmente se usen cultivos alimenticios para su producción, pues muy fácilmente pueden pasar a la cadena alimentaria vía polen o contaminación de plantas “voluntarias” en ciclos agrícolas posteriores destinados a la alimentación. Este tipo de eventos ya ocu-

rrieron y un caso bien documentado es el del maíz productor de avidina de la compañía *ProdiGene*. En 2002 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (*USDA*) impuso una multa de 250,000 dólares más el pago de 2,800,000 dólares porque en 2001 abandonaron en Nebraska un campo de maíz transgénico productor de fármacos y, en el 2002, permitieron la siembra, en el mismo terreno, de soya destinada para alimento (Fox, 2003). La soya fue cosechada y se mezcló con semillas de los maíces "voluntarios" del ciclo agrícola anterior que crecieron entremezclados. En Iowa la misma compañía contaminó un campo de 63 hectáreas de maíz con polen de maíz productor de fármacos, el cual se tuvo que destruir. En la actualidad *ProdiGene* ya está fuera del mercado. ¿Habrán ocurrido otros incidentes como el anterior sin que haya documentación al respecto?

¿Por qué se han usado cultivos de interés alimentario para la producción de este tipo de compuestos? En primer lugar porque es legal, ya que las autoridades encargadas de evaluar las solicitudes de las compañías lo han autorizado. Otras razones son las económicas: se prefiere usar plantas de alto rendimiento, para cuyo cultivo se tienen mejores conocimientos (por ejemplo: maíz, arroz, papa), que plantas no cultivadas. Sin embargo, este tipo de justificaciones cada vez tienen menor aceptación entre el público y aún dentro de la industria, pues el sector agro-alimentario se ha manifestado en contra del uso de estas especies con fines farmacéutico-industriales (Fox, 2003). Además, hay que agregar que los cálculos económicos de la rentabilidad de estas tendencias transgénicas nunca incluyen los costos de los posibles riesgos a la salud y el ambiente. A la fecha, la superficie con plantas transgénicas farmacéuticas cultivadas en campo en Estados Unidos es sumamente pequeña si se le compara con la destinada a alimentos. En el período de 2004 a 2007 se había acumulado un total de 195 hectáreas sembradas con este tipo de cultivos ([www.aphis.usda.gov/brs/ph\\_permits.html](http://www.aphis.usda.gov/brs/ph_permits.html)). Es de llamar la atención que si esta nueva industria apenas está comenzando, y son contadas las siembras que se han hecho, hayan ocurrido casos tan desafortunados como el de *ProdiGene*. Sería de esperarse que aun con reglas más estrictas para su cultivo ocurrieran este tipo de eventos, sobre todo si aumentara considerablemente la superficie plantada, tal como lo vaticina este sector industrial, que han sometido solicitudes para sembrar miles de hectáreas.

Las plantas también sirven como fuente de energía (por ejemplo, en la producción de etanol, que ya se combina con la gasolina como

combustible de autos), aunque por ahora sólo se usa en aproximadamente 1% del total del consumo de combustibles. En la actualidad, la producción de etanol a partir de plantas no resulta energética ni económicamente eficiente, por ello están también explorándose otros combustibles más complejos.

Las plantas también son fuente natural de otras sustancias como vitaminas, proteínas usadas en medicina o en investigación (carbón activado, fenoles y surfactantes usados en la producción industrial). En Estados Unidos se proyecta que para 2090 habrá un 50 y 90% de crecimiento en el uso de bioenergía y bioproductos de uso industrial o farmacéutico, respectivamente. Se espera que la mayor parte de este aumento se derive de plantas de uso agrícola modificadas mediante biotecnología de ADN recombinante. Lo anterior plantea un cambio total en el panorama agrícola del mundo, que pasará de uno enfocado a la producción de alimentos, forrajes y textiles, a uno centrado en el desarrollo industrial basado en la producción de insumos para la industria (energética, farmacéutica o química y de materiales en general).

Este cambio implica transformaciones en la organización económica, ganancias mayúsculas para los dueños de las patentes e industrias en cuestión, y también amenazas importantes para la producción de alimentos, alteraciones en la forma de vida de los productores agrícolas, en el campo y el ambiente, así como riesgos sin precedentes. Muchos de estos escenarios sugieren que muy probablemente no habrá un desarrollo sostenible ni siquiera para las industrias promotoras. Si este es el caso, las plantas no serán, como se espera, fuentes renovables de estos productos, pues si se mezclan, por ejemplo, líneas de maíz que producen diversas sustancias industriales entre sí, en pocos años este cereal básico para la alimentación de una proporción importante de la población humana se habrá vuelto un "basurero" de la industria farmacéutica que ya no se podrá usar para la alimentación, pero tampoco como biorreactor.

Una perspectiva de los planes de desarrollo de esta tecnología de bioprocesos en Estados Unidos se encuentra en: "National Agricultural Biotechnology Report #12 ([www.cals.cornell.edu/extension/nabc](http://www.cals.cornell.edu/extension/nabc)).

El que se haya usado por muchos años las plantas como fuente de medicamentos naturales no justifica el transformarlas para expresar sustancias farmacéuticas, pues por tratarse de plantas alimenticias se anula su vocación primaria. También se esgrime el argumento de la



accesibilidad para argumentar a favor del uso de plantas que expresan fármacos. Por ejemplo, se propone que será conveniente expresar anticuerpos en plantas para minimizar costos. Sin embargo, los costos serán enormes si esto se hace en plantas de uso alimenticio en las cuales es imposible frenar la mezcla entre diversas líneas, como es el caso del maíz. Se está usando también el plátano, aunque en este caso el riesgo de contaminación no existe, porque no hay ya variedades con capacidad de reproducción sexual en la mayor parte de los países en donde se siembra. Esto mismo ha llevado a la homogeneidad genética de este cultivo y al incremento en su susceptibilidad a ciertas enfermedades que amenazan su viabilidad a nivel mundial.

Otro argumento en favor del uso de plantas para producir vacunas es que podrán ser accesibles para una mayor parte de la población sin necesidad de refrigeración. Esto sería favorable para hacerlas llegar a regiones remotas y pobres. Sin embargo, estos desarrollos son en su mayoría privados y como el caso del arroz dorado (*golden rice*), probablemente no serán exitosos salvo como negocio. En cualquier caso, habrá que evaluar cada caso y su contexto para considerar también el tipo y la magnitud de los riesgos que implica su producción y distribución en cada contexto. Pero, nuevamente, el uso de plantas como el maíz, que además de ser la base de la alimentación de un sector importante de la población mexicana y mundial, es de polinización abierta, implica riesgos mayúsculos que en ningún contexto compensa los beneficios sociales potenciales. Además será fundamental analizar cómo es que una economía basada en bioprocesos afectará la vida de agricultores y consumidores. En Estados Unidos se argumenta que los productores agrícolas estadounidenses no podrían subsistir sin el subsidio de su gobierno, el cual asciende a 30 billones de dólares al año. El desarrollo de una economía de bioprocesos se está visualizando como una vía para la sostenibilidad económica del sector agrícola de Estados Unidos. Por ejemplo, documentos acerca de la biotecnología que distribuyen algunas universidades de ese país (como Cornell University) plantean expresamente que: "los agricultores necesitan mayores precios por sus productos. Si ellos cultivan maíz biorreactor que produce alguna proteína específica para usos como medicina, esto requerirá prácticas productivas más sofisticadas y un aumento en el valor de sus productos crudos". Sin embargo, que para el caso del maíz y sin importar cuán sofisticadas sean estas prácticas, el riesgo de contaminación y mezcla es inevitable y sus consecuencias devastadoras para la cadena productiva

y alimentaria del maíz. Además, aun en el caso de que dichos riesgos no existieran, nada garantiza que no sean las grandes corporaciones biotecnológicas las que se queden con la mayor parte de las ganancias de la producción de fármacos en cultivos.

### OGM: Impacto ambiental y en la salud

Los cultivos genéticamente modificados constituyen una tecnología controvertida que, a pesar del debate constante en torno a ella, sigue ganando terreno en las prácticas agrícolas de nuestro país (Figura 4). Debido a esto, es prioritario que el impacto ambiental provocado por éstos y los efectos en la salud de sus consumidores se documenten y estudien de manera constante, seria y objetiva. La evidencia científica generada en el contexto ecológico, genético, evolutivo, fisiológico, molecular y celular, debe ser la base del proceso conocido como "evaluación de riesgo", cuya función es advertir sobre un daño potencial ocasionado por una actividad determinada, en este caso, la liberación de transgénicos en el ambiente.

Las preguntas en materia de salud e impacto ambiental vinculadas con los OGM no son una novedad, sin embargo, la realización y el seguimiento de trabajos que las aborden se han visto entorpecidos en muchas ocasiones por la falta de fondos para llevar a cabo este tipo de estudios por parte de investigadores independientes, y a que los productores de OGM se niegan a brindar los materiales para realizar los análisis (Traavik y Heinemann, 2007). A pesar de esto, existe evidencia suficiente para justificar la apelación al principio precautorio respecto de la liberación de OGM en el ambiente.

### El daño ambiental

La evaluación del impacto ambiental de un cultivo genéticamente modificado es una parte fundamental del proceso regulatorio internacional llevado a cabo antes de que los OGM puedan ser sembrados en campo abierto, ya sea con fines experimentales o comerciales (Dale *et al.*, 2002). Con base en esto, cuatro categorías de daños ambientales se han relacionado con los organismos genéticamente modificados para efectos de las evaluaciones de los mismos (Committee on Environmental Impacts

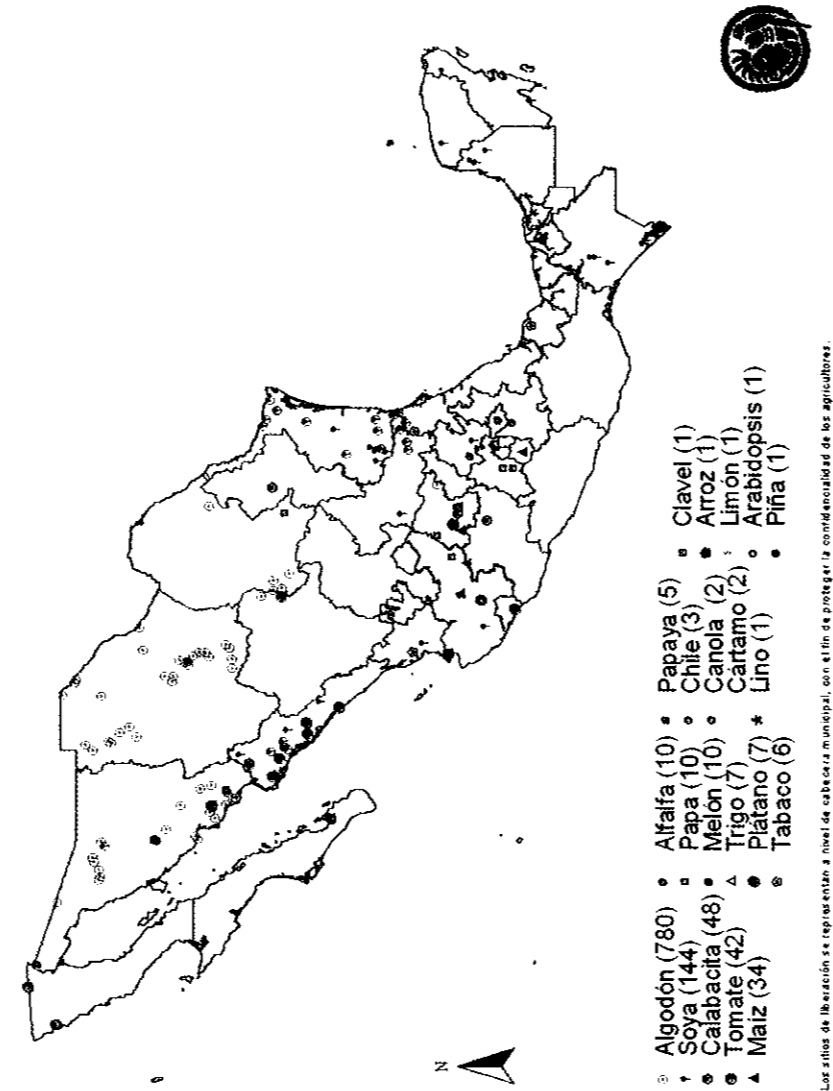
Associated with Commercialization of Transgenic Plants, 2002; Ervin *et al.* 2003; Ellstrand, 2006; Lu y Yang, 2009). El primero está relacionado con el flujo génico, del que ya hablamos en el capítulo 3, por lo que nos enfocaremos sólo en los tres restantes.

*Daños asociados directa o indirectamente con los OGM*

Los organismos genéticamente modificados por sí mismos pueden convertirse en un riesgo ambiental debido a los rasgos conferidos para mejorar su aptitud y rendimiento ecológico. Muchas plantas de cultivo pueden suponer un riesgo muy bajo, en la medida que son incapaces de sobrevivir sin ayuda humana. Con frecuencia, los rasgos que las hacen útiles para los seres humanos también reducen su capacidad para establecerse como poblaciones asilvestradas en los hábitats o ecosistemas agrícolas y no agrícolas. Por ejemplo, la falta del rompimiento de las semillas y de la latencia de las mismas reduce en gran medida la capacidad de un cultivo anual de persistir sin intervención humana (Gepts y Papa, 2003).

Sin embargo, es generalmente el caso que la mayoría de los cultivos tienen malezas y poblaciones silvestres en estrecha asociación con las formas cultivadas en alguna parte de su distribución (De Wet y Harlan, 1975; Ellstrand, 2003a). Dependiendo de la ubicación, algunos cultivos evolucionan hacia un fenotipo de tipo salvaje muy rápidamente y se pueden convertir en poblaciones asilvestradas viables en la generación F<sub>2</sub>. La existencia de estas poblaciones demuestra que los transgenes que confieren adaptación a importantes factores limitantes pueden crear riesgos significativos relacionados con la planta completa, especialmente si los efectos ecológicos de los cultivos GM son evaluados (Gepts y Papa, 2003; Committee on Environmental Impacts Associated with Commercialization of Transgenic Plants, 2002; Hancock, 2003). La frecuencia de las poblaciones asilvestradas de los cultivos también revela la dificultad de distinguir entre los daños provocados por el flujo de genes y aquellos provocados por toda la planta. El flujo de genes entre las poblaciones asilvestradas de los cultivos y los cultivos GM puede generar malezas que contienen adaptaciones derivadas de las plantas asilvestradas, tales como latencia de las semillas, que son suficientes para producir nuevos riesgos de plantas invasoras, por ejemplo, en agroecosistemas (Committee on Environmental Impacts Associated with Commercialization of Transgenic Plants, 2002).

Mapa 1 Autorizaciones de liberación de OGMs al medioambiente de 1988 a 2006 (CONABIO).



Los sitios de liberación se representan a nivel de cabecera municipal, con el fin de proteger la confidencialidad de los agricultores.

Dependiendo de la expresión de los transgenes, los OGM podrían causar un daño ambiental en los factores abióticos asociados a los mismos, como por ejemplo, agua, suelo o aire, reduciendo la calidad del medio ambiente o reduciendo su sustentabilidad (Stotzky, 2000; US Environmental Protection Agency, 2000; Dale *et al.*, 2002; Dunfield y Germida, 2004).

*Daños a los organismos no blanco (los cuales están asociados con los productos de los transgenes)*

Los organismos no blanco son los individuos que no son el objetivo directo de los organismos genéticamente modificados. A la fecha, la gran mayoría de los estudios publicados que examinan esta problemática se han centrado en los cultivos *Bt*. Por ejemplo, el maíz *Bt* es actualmente empleado para controlar las plagas clave, el barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y el barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*) (Ostlie *et al.* 1997), mientras el arroz *Bt* está dirigido contra el barrenador del tallo estriado (*Chilo suppressalis*) y el barrenador del tallo amarillo (*Scirpophaga incertulas*) (Cohen *et al.* 1996). Cualquier otra especie afectada por el maíz *Bt* o el arroz *Bt* es una especie no blanco, en consecuencia, la lista de las posibles especies no blanco es muy extensa. Algunos OGM ni siquiera fueron creados con un blanco específico, sino que se desarrollan, por ejemplo, para sobreexpresar o inhibir alguna característica intrínseca, por lo que todos los organismos afectados por éstos serían entonces organismos no blanco. Estos organismos pueden ser convenientemente agrupados en cinco categorías que no son mutuamente excluyentes: 1) especies benéficas, que incluyen a los enemigos naturales de las plagas (crisopas, catarinas, avispas parásitas, microbios y parásitos) y a los polinizadores (abejas, moscas, escarabajos, mariposas, aves y murciélagos); 2) plagas no blanco; 3) los organismos del suelo; 4) las especies que no entraron en las categorías anteriores y fueron afectadas por los OGM; y 5) daños en especies presentes en otros sistemas productivos (Hilbeck, 1998a; Hilbeck *et al.*, 1998b; Committee on Environmental Impacts Associated with Commercialization of Transgenic Plants, 2002).

*Evolución en organismos blanco*

Los organismos blanco son las especies para las cuales fue diseñado el OGM. La evolución de la resistencia puede ocurrir en las plagas que son objeto de control por parte de o asociado con un OGM (Gould, 2000; Moyes *et al.*, 2002; Senior y Dale, 2002). Este es un peligro ambiental potencial, porque si la plaga se hace resistente al control, alternativamente, pueden ser utilizados más controles dañinos para el ambiente. Además, nuevas tácticas de control pueden ser llevadas a cabo antes de que sus riesgos ambientales sean completamente evaluados. Insectos, malezas y patógenos microbianos tienen el potencial para contrarrestar las tácticas de control utilizadas en su contra (Barrett 1983, Georghiou 1986, Georghiou y Lagunes 1988, Green *et al.* 1990, NRC, 2000). La resistencia de los insectos a los cultivos *Bt* se considera inevitable, y se están haciendo esfuerzos por la US Environmental Protection Agency (EPA) para controlar la evolución de resistencia a estos OGM. No se han utilizado virus resistentes a los OGM ampliamente, pero muchos virus han desarrollado resistencia a los cultivos convencionales. La evolución de las malezas tolerantes a herbicidas es un riesgo ambiental indirecto (Ramachandran, 2000; Van Gessel, 2001). Los OGM tolerantes a los herbicidas están diseñados de tal forma que herbicidas específicos puedan ser utilizados para controlar a las malezas, generalmente después de que el cultivo ha emergido. Estos controles de malezas postemergentes podrían permitir que los herbicidas se utilizaran sólo cuando sea necesario, reduciendo la aplicación de herbicidas a los cultivos. En algunos cultivos estos herbicidas postemergentes pueden reemplazar a otros que son más perjudiciales para el medio ambiente; sin embargo, el resultado puede ser el contrario, teniendo que utilizar herbicidas cada vez más dañinos para el ambiente, activos por más tiempo, o que dañen otros recursos naturales (Committee on Environmental Impacts Associated with Commercialization of Transgenic Plants, 2002).

*Daños a la salud*

Existen pocos trabajos diseñados para encontrar efectos fisiológicos y patológicos producidos por OGM. Más aún, Traavik y Heinemann (2007) encontraron un sesgo alarmante: de estos pocos trabajos, los realizados

por la industria no encuentran ningún problema, mientras que los realizados por grupos de investigación independientes encuentran efectos que ameritaban un mayor seguimiento pero que simplemente no se realizaron. De ahí que ellos hablen del término "investigación omitida", cuyo ámbito evidencia riesgos importantes para la salud y que a su vez constituyen un campo de investigación que es necesario enriquecer. A continuación se presentan éstos:

Daños a la salud y procesos que constituyen áreas de investigación omitida. Riesgos y evidencias

*Integración de construcciones transgénicas cerca de retrotransposones o secuencias repetitivas*

Los riesgos son:

- la introducción de un nuevo promotor transgénico dentro o cerca de elementos retrotransposones o secuencias repetitivas puede conducir a alteraciones espaciales y temporales de los patrones de expresión de los genes localizados cerca o incluso lejos del inserto;
- un promotor fuerte de retrotransposón LTR puede promover la sobreexpresión del transgén;
- los retrotransposones pueden comenzar a "brincar" bajo la influencia de factores (*transacting factors*) reclutados por el inserto;
- pueden ocurrir nuevos arreglos genéticos en los insertos transgénicos, como deleciones o recombinaciones;
- estos eventos pueden tener efectos impredecibles a largo plazo y en la estabilidad genética del OGM, así como en su valor nutricional, alergenicidad y contenido tóxico.

Las evidencias:

- se han reportado deleciones (Mon810, GA21, Bt176), recombinación (T25, GTS 40-3-2, Bt176), secuencias repetitivas en tándem o invertidas (T25, GA21, Bt176) fragmentos transgénicos rearrreglados esparcidos por el genoma (Mon810) (Hernández *et al.*, 2003; Holck *et al.*, 2002; Collonnier *et al.*, 2003; Windels *et al.*, 2001);

- se han detectado integraciones de construcciones transgénicas cerca de retrotransposones (T25, Mon810, GA21) y secuencias repetitivas (Bt11 maize) (Rønning *et al.*, 2003; Jank y Haslberger, 2000).

*El ADN transgénico y sus proteínas pueden permanecer en el tracto gastrointestinal de los mamíferos sin degradarse*

Los riesgos son:

- el desarrollo de padecimientos crónicos;
- alteraciones en los patrones de metilación y transcripción del genoma de las células receptoras que resultan en niveles impredecibles de expresión genética y sus productos;
- incluso los insertos pequeños pueden conducir al llamado proceso de "desestabilización", del que posiblemente surgen las células cancerosas malignas;
- existe la posibilidad de que las moléculas tóxicas, inmunogénicas/alérgicas y carcinogénicas entren al organismo vía las células de las paredes gastrointestinales.

Las evidencias:

- una serie de publicaciones han demostrado que el ADN foráneo y sus proteínas pueden no degradarse y persistir en el tracto gastrointestinal e inclusive ser absorbidos por los intestinos y transportados por la sangre a los órganos internos (Wilcks, 2004).

*Alteración impredecible de las proteínas contenidas en los alimentos genéticamente modificados.*

Los riesgos son:

- la influencia de los insertos de ADN transgénico en los patrones endógenos de expresión genética de la planta puede variar con los factores ambientales locales, el sitio de inserción, el número y la estabilidad de los insertos, los efectos del promotor trans-

génico, los patrones de metilación del inserto y las mutaciones post-transformacionales en la secuencias codificantes y reguladoras de la proteína transgénica;

- la concentración de una proteína transgénica dada puede variar de acuerdo con la localización en el genoma del organismo receptor de la construcción de ADN transgénico, y a los factores ambientales que influyen la actividad de los elementos regulatorios transgénicos (como el promotor 35s CaMV);
- los efectos biológicos de una proteína transgénica como la toxina *Bt CryIAb* o el inhibidor de  $\alpha$ -amilasa pueden ser influenciados impredeciblemente por modificaciones post-traduccionales, *splicing* alternativo, codones de inicio alternativos para la transcripción, marcos de lectura quiméricos que resultan de la integración de la construcción transgénica en el marco de lectura del gen de la planta y la compleja formación con proteínas endógenas.

Las evidencias:

- la expresión transgénica del inhibidor-1  $\alpha$ -amilasa (áAI) del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) en el chícharo (*Pisum sativum* L.) condujo a la síntesis de una forma estructuralmente modificada de dicha proteína. Se demostró en ratas que el consumo del áAI modificado las predisponía a una inflamación de tipo antígeno específico CD4<sup>+</sup> Th<sub>2</sub>. Esto sugiere que la diversidad de las rutas de modificación traduccionales y post-traduccionales entre especies podría conducir a cambios discretos en la arquitectura molecular de la proteína expresada y su subsecuente función celular y antigenicidad (Prescott *et al.*, 2005).

#### Alergias

Los riesgos son:

- el producto transgénico puede cambiar la expresión de genes endógenos de la planta o las reacciones químicas que se llevan a cabo cuando se cocinan los alimentos, lo cual puede resultar en la exposición a compuestos alergénicos;

- las pruebas de alergenidad se realizan con proteínas transgénicas producidas en bacterias, no en plantas. La glicosilación es un proceso que invariablemente sucede en las plantas mas no en las bacterias, así que en las pruebas de alergenidad realmente no se está analizando esta modificación post-traduccionales de la proteína transgénica y de las proteínas endógenas. Ciertas características alergénicas de las proteínas y también su resistencia a la degradación en el organismo pueden estar afectadas por la glicosilación.

Las evidencias:

- en Estados Unidos, en la cadena alimentaria se encontraron trazas de la toxina *Bt Cry9C* de un maíz transgénico (*Starlink*) no autorizado para consumo humano, lo que provocó graves problemas de reacciones alérgicas (Bucchini y Goldman, 2002);
- cuando se insertó un gen de la nuez de Brasil en la soya se reportaron casos de alergia fuerte en las personas que la consumieron, quienes nunca habían tenido problemas alérgicos con esta planta (Nordlee *et al.*, 1996).

#### Peligros asociados a los genes marcadores de resistencia a antibióticos

Los riesgos son:

- se sabe que existen muchos mecanismos que generan resistencia cruzada a antibióticos, por lo cual no se puede descartar una reacción de este tipo por organismos transgénicos que presentan un gen marcador de resistencia a determinado antibiótico;
- la kanamicina es un miembro de la familia de los antibióticos aminoglicósidos. Existen aproximadamente 17 clases diferentes de enzimas que los modifican, las cuales pueden inactivar hasta a 4 diferentes aminoglicósidos.

Las evidencias:

- se ha observado resistencia cruzada entre la kanamicina y otros aminoglicósidos empleados en el tratamiento de enfermedades

humanas, como la gentamicina y la tobramicina (Mikkelsen *et al.*, 1999);

—el antibiótico neomicina reacciona de manera cruzada con la kanamicina B inhibiendo el ARN ribosomal 16S ribozima P RNasa y la maduración del ARNt (Mikkelsen *et al.*, 1999).

### ¿Una tecnología inadecuada para México?

Actualmente nuestro país está entre los 10 principales productores de maíz a nivel mundial y este cultivo ocupa el primer lugar en hectáreas cultivadas en México. Si bien el maíz se cultiva en todo el país, se hace de maneras diversas. En el norte, en estados como Sinaloa y Tamaulipas y algunas zonas del Altiplano o del Bajío, el cultivo de maíz se lleva a cabo en parcelas de gran extensión con una agricultura tecnificada y muchos insumos, como semilla mejorada, fertilizantes químicos y pesticidas. En el centro y sur de México se lleva a cabo en parcelas más pequeña y menos insumos, en el contexto de una agricultura diversificada de milpa, que incluye maíz acompañado comúnmente de frijol, chayote, calabacitas y hierbas comestibles o quelites, entre otros.

La milpa es un sistema agroecológico robusto y sustentable que asegura un abasto diverso de alimentos complementarios de elevada calidad nutricional. Además, la interdigitación, extensión y complejidad de los sistemas de producción de maíz en todo México hacen que el riesgo de flujo génico, y con ello los otros riesgos y peligros intrínsecos a los niveles inferiores descritos en las secciones 1, 2 y 3, sean muy grandes. Esto debería ser suficiente para cancelar el uso de los transgénicos de maíz disponibles en el mercado como opción tecnológica para nuestro país. Pero además, los desarrollos actuales son insuficientes para las condiciones de México (Acevedo *et al.*, 2011) y ni siquiera son sustentables en las condiciones para las cuales fueron desarrollados.

De los tipos de maíz transgénico disponibles comercialmente, el que se ha adoptado con mayor éxito es el maíz *Bt* resistente a insectos, el cual representa la mayor proporción del total de maíz transgénico sembrado a nivel mundial (James, 2007). Las proteínas *Cry* de los tipos de maíz transgénico más ampliamente comercializados (*Cry1Ab/Ac* y *Cry1c*) no son eficaces para el control de las plagas de maíz mexicanas, como *Spodoptera frugiperda* (Bravo *et al.*, 1998). Esto implica que, además de los riesgos y peligros implicados en el uso de maíz transgénico en

México, este desarrollo no proporcionan beneficios potenciales para el cultivo de maíz en nuestro país.

Las líneas de maíz transgénico tolerantes a herbicidas más usadas son las que expresan la proteína EPSPS recombinante proveniente de la cepa CP4 de la bacteria *Escherichia coli*. Esta línea es tolerante al herbicida glifosato que inhibe la producción de los aminoácidos aromáticos, en particular, el triptofano; la falta de esta molécula mata a las plantas. En México, esta variedad es incompatible con el policultivo de la milpa, ya que los herbicidas afectan a todas las plantas, y mataría a todas las especies que acompañan al maíz en la milpa. La primera consecuencia negativa del uso de este desarrollo sería el empobrecimiento de la dieta de aquellas familias que decidan utilizar semilla resistente a herbicidas. También se contaminarían los suelos y cuerpos de agua por el lixiviado de estos agroquímicos no biodegradables. Esto está sucediendo en países como Argentina, en donde se siembran grandes extensiones de cultivos de soya resistente al glifosato. En el Capítulo 5 se describen las consecuencias en salud de este agrotóxico.

Por otro lado, existe la posibilidad de transferencia vía flujo génico de genes de tolerancia a herbicidas hacia plantas como el teocintle. De este existen varias especies en México, que comúnmente conviven con el maíz y son interfértiles con el mismo. El teocintle es tolerado en ciertos niveles aparentemente porque favorece la transferencia de genes útiles al maíz. Sin embargo, el uso de maíz RR puede llevar a la introgresión del gen de tolerancia al teocintle y a la evolución, por exposición repetida al herbicida, de teocintles y otras malezas tolerantes, como ya se ha comentado en este texto.

Otros de los riesgos que han sido más ampliamente discutidos e investigados es la afectación de los insectos no blanco y la microbiota del suelo. Esto se puede dar en varios niveles: debido al consumo de proteínas *Cry* que lleva la planta o de los exudados de las raíces de una planta transgénica. En este sentido, estudios recientes comprueban el daño a catarinas del consumo de maíces transgénicos que producen *Cry1Ab* aumenta la mortalidad de estos insectos importantes para el control de plagas agrícolas (Hilbeck *et al.*, 2012). También se podría modificar la cadena trófica en los agroecosistemas por la eliminación de los insectos blanco, así como por el desarrollo de resistencia en éstos a las diferentes versiones de proteínas *Cry* expresadas por los distintos tipos de maíz transgénico, dando lugar a una carrera "armamentista" entre insectos resistentes y variedades de maíz *Bt*. Estos insectos resistentes eventual-

mente podrían volverse una plaga de grandes dimensiones en caso de salirse de control y evolucionar mecanismos que los hagan resistentes a una gran variedad de proteínas *Cry* expresadas por los transgénicos, en cuyo caso habría que echar mano de pesticidas tóxicos. Este escenario no es nada remoto y, por ello, desde un inicio fueron establecidas estrategias de retardo en la evolución de esta resistencia por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Estas estrategias no han sido seguidas ni suficientes en aquél país y lo serían menos en México.

Además de estas insuficiencias y riesgos se ha demostrado que los maíces transgénicos usados hasta ahora no aumentan de manera neta el rendimiento, pues no fueron desarrollados para ello ([http://www.ucsusa.org/food\\_and\\_agriculture/our-failing-food-system/genetic-engineering/failure-to-yield.html](http://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/our-failing-food-system/genetic-engineering/failure-to-yield.html)). En algunos casos lo disminuyen, y en pocos implican aumentos menores a los que se podrían alcanzar con el uso de híbridos mejorados disponibles en las instituciones públicas de México. Los híbridos mexicanos, en combinación con otras prácticas agrícolas, sí podrían generar aumentos significativos en el rendimiento de maíz en México, cuyo promedio de cosecha por hectárea en la actualidad es de alrededor de 3 toneladas por hectárea, frente a las 12 toneladas por hectárea cosechadas en Estados Unidos y otros países. En México sólo se alcanzan estos niveles en algunos estados del norte, en el contexto de una agricultura industrializada, sin uso de transgénicos, como es el caso del estado de Sinaloa.

### Consideraciones finales

La influencia de variables e interacciones ecológicas en un organismo recombinante pueden tener implicaciones ambientales y también riesgos potenciales a la salud de sus consumidores (incluyendo un buen número de especies silvestres, animales domésticos y el ser humano). Muchos de estos riesgos y peligros no se han considerado explícitamente en las evaluaciones de riesgo oficiales. Es el caso del uso de secuencias como el promotor viral (35S del CaMV) y los efectos en la integridad genómica de la transgénesis; la posibilidad de flujo génico a larga distancia por el intercambio o mezcla de diversos acervos de semillas, o la transferencia de genes a variedades locales cultivadas y parientes silvestres.

Lo anterior se suma al hecho de que en nuestro país no se cuenta con la infraestructura necesaria para llevar a cabo estudios de biomo-

nitoreo, los cuales necesitan del uso de herramientas de la biología molecular para detectar las secuencias transgénicas en una muestra de tejido, semilla o sus derivados. Los estudios de biomonitorio realizados en nuestro país hasta la fecha, estimulados por el primer reporte de la presencia de transgenes en razas nativas de maíz en la Sierra Norte de Oaxaca (Quist y Chapela, 2001), aún no cuentan con estándares unificados en términos de los esquemas de muestreo o de los métodos moleculares a usarse. Es urgente establecer dichos estándares para poder contar con datos confiables acerca de la presencia de transgenes en los acervos mexicanos, así como su tipo y sus vías de entrada, con el fin de establecer medidas para rectificar la posible contaminación (ver Capítulo 13).

Adicionalmente, para aquellos grupos campesinos que no deseen sembrar cultivos transgénicos por razones diversas (por ejemplo, para acceder a mercados preferenciales de orgánicos y otros que exigen que estén libres de transgénicos), la LBOGM debe establecer responsabilidad social del agente "contaminante", quien debe asumir el costo del monitoreo y la remediación si es necesaria. Sin embargo, actualmente la LBOGM transfiere dicha responsabilidad y costos a las personas o grupos que no desean tener transgénicos en sus acervos de semilla.

Dada la evidencia presentada, el único mecanismo de protección real del maíz mexicano es, con base en el principio precautorio (ver recuadro y capítulo 10), reinstaurar la moratoria a la siembra de maíces transgénicos a campo abierto en México, bajo cualquier modalidad de uso, y a su vez realizar un estudio cuidadoso y extensivo de los transgenes que están penetrando la cadena productiva y de consumo de maíz, así como proponer estrategias para evitar esta infiltración por completo,

#### EL PRINCIPIO PRECAUTORIO

Cuando haya sospechas razonables de que una determinada tecnología pueda producir daños severos a la sociedad o al ambiente, y existan razones para pensar que tal daño puede llegar a ser irreversible, debe impedirse el uso de esa tecnología, aun cuando la evidencia disponible en el momento sobre estos daños potenciales no cumpla los estándares exigidos usualmente en las investigaciones científicas para considerar una hipótesis como verificada.

como fue propuesto por el informe de la Comisión de Cooperación Ambiental.

#### Alternativas tecnológicas para México

En México se podrían combinar los conocimientos y riqueza de maíces nativos con ciencia y técnicas de biología molecular y genética de frontera para buscar alternativas sustentables de mejoramiento genético asistido. Esta estrategia se podría complementar con otros avances tecnológicos que estén diseñados para resolver o prevenir problemáticas agrícolas, alimentarias o ambientales apremiantes, propias de nuestro país. Ante las incertidumbres del mercado de granos básicos, este tipo de desarrollos tecnológicos más apropiados a las condiciones mexicanas serían una de las vías más seguras para recuperar la autosuficiencia alimentaria en un marco de seguridad alimentaria, soberanía y agricultura sustentable.

Por todo lo anterior, es crucial y urgente que el gobierno mexicano: a) establezca con rigor qué tipo de transgenes están ya en las cadenas productivas y alimentarias del maíz; b) haga un escrutinio cuidadoso que asegure establecer cuáles son las vías de entrada de los transgenes encontrados; c) en caso de presencia de transgenes, que implemente mecanismos eficaces para no permitir que sigan entrando y con ello evitar la contaminación de nuestro acervo de maíz con transgenes que codifican para sustancias no aptas para el consumo animal y humano.

En un aspecto más general, el creciente impacto de la ciencia en la naturaleza y la sociedad hace inminente la necesidad de principios éticos en el quehacer científico, que incluyan consideraciones ambientales y económicas. La ciencia debe ejercerse con responsabilidad social y ambiental y todos los científicos debemos asumir activamente la responsabilidad de nuestro trabajo. Esto implica participar activa y transparentemente con otros sectores de la sociedad para evaluar, informar y ayudar a prevenir los riesgos que pueden derivarse de la aplicación de los resultados de nuestro trabajo en los distintos contextos ambientales y sociales que éstos puedan ser usados. Por ello, es importante fomentar una ciencia y un desarrollo tecnológico que incorporen consideraciones éticas, no sólo pertinentes para las relaciones entre individuos, sino también para la relación de los seres humanos con el resto de la naturaleza y consciente ante los efectos económicos y sociales que los desarrollos tecnológicos puedan tener en diversos contextos.

#### Referencias

- Acevedo, F., Huerta, E., Burgeff, C., Koleff, P., Sarukhán, J. (2011) Is-transgenic maize what Mexico really needs? *Carta a Nature*, 29(1), 23-24.
- Allenspach E, Rawlings D, Scharenberg A. (2003) *X-Linked Severe Combined Immunodeficiency*. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benitez, M., Balleza Davila, E., Chaos, A. Espinosa-Soto, C. & Padilla-Longoria, P. et al. (2007) *Gene regulatory network models for plant development*. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 83-91.
- Andow, D., Lamkey, K., Daniell, H., Nafziger, E., Gepts, P., Strayer, D. (2004) *Growing Concern: Protecting the food supply in an era of pharmaceutical and industrial crops*. Union of Concerned Scientists, 132.
- Baker, J.M., Hawkins, N.D., Ward, J.L., Lovegrove, A., Napier, J.A., Shewry, P.R., Beale, M.H. (2006) A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 4(4), 381-392
- Barrett, S.C.H. (1983) Crop mimicry in weeds. *Economic Botany*, 37, 255-282.
- Benz, B. (2001) Archeological evidence of teosinte domestication from Guila Naquitz, Oaxaca. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 2104-2106.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, E., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F., Peña, G., Nuñez-Valdez, M.E., Soberón, M., Quintero, R. (1998) *Characterization of cry genes in a Mexican Bacillus thuringiensis strain collection*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4965-4972.
- Bucchini, L. and Goldman, L.R. (2002) Starlink corn: a risk analysis. *Environ Health Perspect*, 110,5-13.
- Cohen, M.B., A.M. Romena, R.M., Aguda, A., Dirie, & F.L. Gould. (1996) *Evaluation of resistance management strategies for Bt rice*. In *Proceedings, Second Pacific Rim conference in biotechnology of Bacillus thuringiensis and its impact to the environment*. Bangkok: Entomology and Zoology Association of Thailand, 496-505.
- Collonnier et al. (2003) *Characterization of commercial GMO-inserts: A source of useful material to study genome fluidity?*. Poster.



- Committee on Environmental Impacts Associated with Commercialization of Transgenic Plants, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council (2002) *Environmental effects of transgenic plants: The Scope and Adequacy of Regulation*. National Academies Press.
- D'Aiuto L et al. (2006) Evidence of the capability of the CMV enhancer to activate in transgene expression in mammalian cells. *DNA and Cell Biology*, 25, 171-180.
- Dale, P. J., Clarke, B., & Fontes, E. M. (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature biotechnology*, 20, 567-574.
- Doebley, J., Stec, A., Gustus, C. (1995) Teosinte branched1 and the Origin of Maize: Evidence for Epistasis and the Evolution of Dominance. *Genetics*, 141, 333-346.
- Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2004) Impact of Genetically Modified Crops on Soil- and Plant-Associated Microbial Communities. *J. Environ Qual*, 33(3), 806-815.
- De Wet, J. M. J. & J. R. Harlan. (1975) Weeds and domesticates: evolution in the man-made habitat. *Economic Botany*, 29, 99-107.
- Ellstrand, N. C. 2003a. *Dangerous Liaisons? When Cultivated Plants Mate with Their Wild Relatives*. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ Pr., 244.
- Ellstrand, N. C. (2003b) Going to "Great Lengths" to Prevent the Escape of Genes That Produce Specialty Chemicals. *Plant Physiology*, 132, 1770-1774.
- Ellstrand, N. C. (2006) Scientists evaluate potential environmental risks of transgenic crops. *California Agriculture*, 60, 119-125.
- Editorial: Drugs into crops—the unpalatable truth (2004) *Nature Biotechnology*, 2(2).
- Editorial: Consequences (2006) *Nature Biotechnology*, 24 (368).
- European Food Safety Authority; EFSA. (2006) Guidance Document of the scientific panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of Genetically Modified Microorganisms and their derived products intended for food and feed use. *The EFSA Journal*, 374, 1-115
- Ervin, D. E., R., Welsh, S. S. Batie y C. L. Carpentier (2003) Towards an ecological systems approach in public research for environmental regulation of transgenic crops. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 99, 1-14.
- Filipecki M. and Malepszy S. (2006) Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J Appl Genet*, 47, 277-286.

- Fox, J. L. 2003. Puzzling industry response to Prodigene fiasco. *Nature Biotechnology* 21, 3-4.
- Gasson M y Burke D. (2001) Scientific perspectives on regulating the safety of genetically modified foods. *Nat Rev Genet*, 2, 217-22.
- Georghiou, G. P. (1986). *The magnitude of the resistance problem*. In *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 14-34.
- Georghiou, G. P., and A. Lagunes. (1988) *The Occurrence of Resistance to Pesticides: Cases of Resistance Reported Worldwide Through 1988*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gepts, P y R. Papa (2003) Possible effects of (trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Environmental Biosafety Research*, 2, 89-103.
- Gould, F. (2000) Testing Bt refuge strategies in the field. *Nat. Biotechnol*, 18, 266-267.
- Green, M. B., H. M. LeBaron, and W. K. Moberg, eds. (1990). *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies*. Washington, DC: American Chemical Society.
- Guilley H., Dudley R. K., Jonard G., Balazs E., Richards K. E. (1982). Transcription of Cauliflower Mosaic Virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*, 30, 763-773.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulfraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J., Fraser, C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003) *A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency*. *New England Journal of Medicine*, 348;3, 255-256.
- Hancock, J. F. (2003) A framework for assessing the risk of transgenic crops. *BioScience*. 53(5), 512-519.
- Hemm, M. R. et al. (2003) The Arabidopsis ref2 mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* 15, 179-194.
- Hernández et al. (2003). A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize Yield Guard based on the 3-transgene integration sequence. *Transgenic Research*, 12, 179-189.
- Hilbeck, A. (1998a) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperia carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) *Environ. Entomol*, 32, 1355-1361.

- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A & Bigler, F. (1998b) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* CryAb toxin to the predator *Chrysoperia carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) *Environ. Entomol.*, 27, 1255-1263.
- Hilbeck, A., McMillan, J.M., Meier, M., Humbel, A., Schlapfer-Miller, J., Trtikova, T. (2012) A controversy re-visited: Is the coccinellid *Adalia bipunctata* adversely affected by Bt toxins?. *Environmental Sciences Europe* 24(10); <http://www.enveurope.com/content/24/1/10>
- Holck et al. (2002). '5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON810 MaisGard maize'. *Eur Food Res Technol*, 214, 449-453
- Howard, J.A. (2005). Commercialization of Biopharmaceutical and Bioindustrial Proteins from Plants. *Crop Sci.*, 45, 468-472
- James, C. (2007). 2007 ISAAA Report on Global Status of Biotech/ GM Crops. [www.isaaa.org](http://www.isaaa.org)
- Jank and Haslberger (2000) Recombinant DNA insertions into plant retrotransposons. *Trends in Biotechnology*, 18, 326.
- Kapoor, M; Baba, A; Kubo, K; Shibuya, K; Matsui, K; Tanaka, Y; and Takatsuji, H. (2005) Transgene-triggered, epigenetically regulated ectopic expression of a flower homeotic gene pMADS3 in *Petunia*. *The Plant Journal*, 43, 649-661.
- Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA, Christou P. (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant Journal*, 17, 591-601.
- Kramer, K.J., Morgan, T.D., Throne, J.E., Dowell, F.E., Bailey, M., Howard, J.A. (2000) Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotechnology*, 18, 670-674.
- Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA. (2006) The mutational consequences of plant transformation. *J Biomed Biotechnol*, 2006:1-7.
- Lakshminarayan, M.I, Kumpatla, S.P, Chandrasekharan, M.B., Hall, T. (2000) Transgene silencing in monocots. *Plant Molecular Biology*, 43, 323-346.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., Sussman, J.L. (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), 5076-5080.

- Lu y Yang (2009) Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: Assessing potential ecological consequences. *Biotechnology Advances*, 27, 1083-1091
- Ma, et al. (2005) Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO Reports* 6(7), 593-599.
- Malone, L.A., Pham-Delegue, M-H. (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 32, 287-304
- Mangano et al. (2007) Mortality Associated With Aprotinin During 5 Years Following Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *JAMA*, 297(5), 471-479.
- Matthews D et al. (2005) Toxic secondary metabolite production in genetically modified potatoes in response to stress. *J. Agric. Food Che.*, 53, 7766-7776.
- Matzke MA and Matzke AJM. (1996) Stable epigenetic states in differentiated plant cells: implications for somaclonal variation and gene silencing in transgenic plants. In: Russo et al., eds. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. NY: Cold Spring Harbor Press: 377-392.
- Mellon, M., Rissler, J. (2004) *Gone to seed: transgenic contaminants in the traditional food supply*. *Union of Concerned Scientists*, 80; [http://www.ucsusa.org/food\\_and\\_agriculture/science\\_and\\_impacts/impacts\\_genetic\\_engineering/gone-to-seed.html](http://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/science_and_impacts/impacts_genetic_engineering/gone-to-seed.html)
- Mikkelsen et al. (1999) Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6155-6160.
- Millstone, E., Brunner, E., Mayer, S. (1999) Beyond 'substantial equivalence'. *Nature*, 401, 525-526.
- Moyes, C.L. et al. (2002) Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Mol. Ecol*, 11, 102-112.
- Myhre, M.R., Fenton, K.A., Eggert, J., Nielsen, K.M. and Traavik, T. (2006) The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *Eur Food Res Technol*, 222, 185-193.
- Netting, J. (2000) *Aventis gets short shrift over release of modified corn*. *Nature* 408, 395.
- News (2007) *Special report Out of bounds*. *Nature* 445, 132-133.
- Nordlee, J.A., Taylor, S.L., Townsend, J.A., Thomas, L.A., Bush, R.K. (1996) Identification of a Brazil-Nut Allergen in Transgenic Soybeans. *N Engl J Med*, 334, 688-692.

- NRC (National Research Council) (2000) *Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation*. Washington, DC: National Academy Press.
- Ostlie, K.R., W.D., Hutchinson, & R.L., Hellmich, (Eds) (1997) *Bt Corn and European corn borer. NCR publication 602*. St. Paul: University of Minnesota.
- Prescott, V.E., Campbell, P.M., Moore, A., Mattes, J., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Higgins, T.J.V. and Hogan, S.P. (2005) Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J Agric Food Chem*, 53, 9023-9030.
- Quist, D, Chapela, I (2001) Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, 414, 541-543.
- Ramachandran, S., Buntin, D., All, J.N., Raymer, P.L. & Stewart, C. N. (2000) Intraspecific competition of an insect-resistant transgenic canola in seed mixtures. *Agron. J.*, 92, 368-374.
- Rang A, Linke B, Jansen B, (2005) Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur Food Res Technol*, 220, 438-443.
- Recillas-Targa F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol Biotechnol* 34, 337-354.
- Romer S. et al. (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol*, 18, 666-669.
- Rønning et al. (2003) Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea Mays*). *Eur Food Res Technol*, 216, 347-354.
- Saxena, D., Stotzky, G. (2001) Bt corn has a higher lignin content than non-bt corn. *American Journal of Botany*, 88(9), 1704 -1706.
- Senior, I.J. & Dale, P. J. (2002) Herbicide tolerant crops in agriculture: oilseed rape as a case study. *Plant Breed*, 121, 97-101.
- Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.F., DeKolver R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.H., Arnold, N.E., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., Rock, J.M., Wu, Y., Katibah, G.E., Zhifang, G., McCaskill, D., Simpson, M.A., Blakeslee, B., Greenwalt, S.A., Butler, H.J., Hinkley, S.J., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459, 437-442.

- Spiroux de Vendomois, J., Roullier, F., Cellier, D., Séralini, G-E. (2009) A Comparison of the Effects of Three GM Corn Varieties on Mammalian Health. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(7),706-726
- Stotzky, G. (2000) Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.* 29, 691-705.
- Steinbrecher, R. (2002) *The CaMV 35S Promoter Government and Corporate Scientific Incompetence: Failure to assess the safety of GM crops*. ECONEXUS Briefing December.
- Takano M et al. (1997). The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J.*, 11, 353-61.
- Traavik, T., Heinemann J. (2007) Genetic Engineering (GE) and Omitted Health Research: Still No Answers to Ageing Questions. *TWN Biotechnology & Biosafety Series*, 7, 36.
- Traavik, T., Nielsen, K.M. and Quist, D. (2007) Genetic Engineering of Living Cells and Organisms, In: Traavik, T and Lim, L.C. (Eds.) *Biosafety First-Holistic Approaches to Risk and Uncertainty in Genetic Engineering and Genetically Modified Organisms*, Tapir Academic Press Trondheim, Noruega. Chapter 4, 1-23.
- US Environmental Protection Agency. (2000) *Sets of scientific issues being considered by the Environmental Protection Agency regarding Bt plant-pesticides risk and benefit assessments* (SAP Report No. 2000-07, FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, October 18-20, 2000) (EPA, Washington, DC)
- Van Gessel, M.J. (2001) Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.*, 49,703-705.
- Wang, H., Nussbaum-Wagler, T., Li, B., Zhao, Q., Vigouroux, Y., Faller, M., Bomblies, K., Lukens, L., Doebley, J.F. (2005) The origin of the naked grains of maize. *Nature*, 436, 714-719.
- Wilcks, A., van Hoek, A.H., Joosten, R.G., Jacobsen, B.B., Aarts, H.J. (2004) *Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation*. *Food Chem Toxicol.* 42(3):493-502.
- Windels et al. (2001) Characterisation of the Roundup Ready soybean insert'. *Eur Food Res Technol* 213, 107-112;
- Zolla, L., Rinalducci, S., Antonioli, P., Riguetti, P.G. (2008) Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. *Journal of Proteome Research*, 7, 1850-1861.