



CAPÍTULO 5
RIESGOS POTENCIALES NO PREVISTOS DE LOS ALIMENTOS
TRANSGÉNICOS

△

Rubén López-Revilla y Claudio Martínez Debat

En este capítulo, desarrollaremos dos aspectos que no han sido tratados en profundidad en el capítulo 4. En la primera parte, se discuten los riesgos a la salud de las proteínas Cry, y en la segunda parte, los efectos tóxicos del glifosato y sus formulaciones comerciales.

Riesgos de los alimentos derivados de plantas transgénicas que expresan proteínas entomopatógenas de *Bacillus thuringiensis*

Las toxinas entomopatógenas de Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (Bt) fue descrito por Berliner en 1901, quien lo aisló de una polilla de la harina y designó la especie por la provincia alemana de Turingia, donde encontró la polilla infectada. Aunque esa fue la primera descripción, la especie bacteriana había sido aislada e identificada en 1901 en Japón y llamada *Bacillus sotto* por Shigetane Ishiwatari, durante la investigación de una enfermedad del gusano de seda. Bt fue considerado originalmente como un riesgo para el cultivo del gusano de seda, pero se ha vuelto un recurso central para el control microbiano de los insectos (Roh *et al.* 2007, Sanahuja *et al.* 2011).

Bt, miembro del grupo *Bacillus cereus* de bacterias Gram positivas esporuladas del suelo, se caracteriza por producir cristales proteínicos

durante la esporulación. Las bacterias que pierden la capacidad de formar cristales son indistinguibles de *B. cereus* y pueden ser transformadas como *B. thuringiensis* por un plásmido que contiene los genes que confieren la capacidad de formar cristales. Las proteínas cristalinas (Cry) y citolíticas (Cyt) se definen como proteínas de inclusión paraesporal de Bt con efectos tóxicos sobre algunos insectos y nemátodos (Cry), con actividad hemolítica (Cyt), o con secuencias similares a las de alguna proteína Cry o Cyt conocida (Bravo *et al.* 2007). Los genes que codifican las proteínas Cry/Cyt son transcritos durante la esporulación por una polimerasa específica sintetizada también durante la formación de las esporas (Sanahuja *et al.* 2011).

Las propiedades insecticidas de los cristales fueron descubiertas al observar que orugas de la polilla de la harina muertas estaban cargadas de esporas y cristales. El contacto con esporas o cristales no afectaba a las orugas sanas, pero éstas dejaban de alimentarse y morían cuando las esporas o cristales eran empleados para cubrir las hojas de las que se alimentaban. Luego de reconocer su potencial insecticida, en 1927 Mattes (citado por Sanahuja *et al.* 2011) aisló una cepa de Bt y obtuvo resultados promisorios en pruebas de campo contra el barrenador europeo del maíz, que condujeron al desarrollo de Sporeine, insecticida Bt comercial usado por primera vez en 1938 (Sanahuja *et al.* 2011).

A principios de los años ochenta se descubrió que los genes de las proteínas Cry se localizan en plásmidos transmisibles y fueron clonados genes de proteínas Cry tóxicas contra larvas del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) contenidos en el plásmido de Bt var. kurstaki HD-1. Pronto fueron clonados otros genes Cry, se demostró que con ellos las plantas pueden ser modificadas por ingeniería genética y en 1996 llegó al mercado el algodón Bt (Roh *et al.* 2007).

Mecanismo de acción y diversidad de las toxinas Cry

Las proteínas Cry y Cyt tienen alta especificidad para los insectos blanco y pertenecen a la clase de toxinas bacterianas llamadas toxinas formadoras de poros (TFP), las cuales son secretadas como proteínas hidrosolubles que requieren cambios conformacionales para insertarse en o traslocarse a través de las membranas celulares de sus hospederos (Bravo *et al.* 2007).

Hay dos grupos principales de TFP: 1) toxinas helicoidales- α cuyas regiones de α -hélice que forman el poro transmembranal y 2) toxinas de barril- β que al insertarse en las membranas conforman un barril compuesto por las asas de tiras β de cada monómero. La primera clase incluye a las toxinas Cry de tres dominios, a las colicinas, la exotoxina A y la toxina diftérica. Las toxinas de barril β incluyen a las toxinas Cyt y otras. Las TFP generalmente interactúan con receptores específicos en la superficie de las células del hospedero y en la mayoría de los casos son activadas por proteasas del hospedero después de que su unión al receptor induce la formación de una estructura oligomérica inserción-competente (Bravo *et al.* 2007).

Las proteínas Cry son tóxicas para lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros y nemátodos, en tanto que las toxinas Cyt se encuentran mayormente en cepas Bt activas contra dípteros. Las Cry comprenden al menos 50 subgrupos con más de 200 miembros y se definen como proteínas Bt de inclusión paraesporal con efectos tóxicos sobre un organismo blanco o secuencia similar a otra proteína Cry conocida (Bravo *et al.* 2007).

La identidad de la secuencia génica primaria es la base de la nomenclatura de las proteínas Cry y Cyt. Los miembros de la familia de tres dominios, grupo principal de las Cry, son moléculas globulares; un amplio grupo tiene cadenas polipeptídicas con el doble de largo que la mayoría de este tipo de toxinas. El extremo C-terminal de las protoxinas largas no tiene actividad tóxica y parece determinar la formación de los cuerpos de inclusión cristalinos (Bravo *et al.* 2007).

Las estructuras terciarias sugieren un mecanismo de acción similar entre las proteínas CryI de tres dominios. El dominio N-terminal (dominio I) es un haz de siete hélices α , con la hélice central hidrofóbica rodeada por hélices anfipáticas, del cual depende la inserción a la membrana y la formación del poro. El dominio II consta de tres tiras β antiparalelas con regiones de asas expuestas. El dominio III es un emparedado β . Las regiones expuestas en los dominios II y III están involucradas en la unión al receptor. La similitud del dominio I con los de otras toxinas TFP apoya su papel en la formación del poro. Las estructuras de los dominios II y III, similares a las de varias proteínas que unen carbohidratos, sugieren que los azúcares están implicados en el mecanismo de acción de las toxinas Cry de tres dominios (Bravo *et al.* 2007).

Diversificación y expansión de los cultivos Bt comerciales

Después de exitosas pruebas de laboratorio, en 1986 se hicieron en Estados Unidos y Francia las primeras pruebas de campo con tabaco Bt transgénico que expresaba un gen truncado que codificaba el extremo N-terminal (tóxico) de Cry1Ac de Bt var. kurstaki HD-73 bajo control del promotor 35S constitutivo del virus del mosaico de la coliflor y protegía a las plantas del daño por un gusano que infesta algodón, maíz y tomate. Luego se demostró que papas transgénicas que expresaban Cry3A de Bt var. tenebrionis eran mejor protegidas contra el escarabajo de la papa que con aspersión tópica; esas papas transgénicas fueron destinadas al mercado y poco después empezaron las pruebas con algodón, maíz y arroz (Sanahuja *et al.* 2011).

En 1995 la Agencia de Protección del Ambiente (EPA por sus siglas en inglés) de Estados Unidos aprobó el primer registro de cultivos Bt de papa, maíz y algodón. Primero llegó al mercado la papa NewLeaf de Monsanto que expresa Cry3A, seguida por dos líneas transgénicas de maíz híbrido que expresan "CryAb" y protegen contra el barrenador del maíz. Monsanto liberó dos variedades de algodón que expresan una toxina Cry1Ac modificada. Luego fueron liberadas dos variedades de maíz Bt que expresan Cry1Ab, entre las que se encontraba la variedad YieldGard (evento MON 810). NewLeaf y sus sucesores fueron retiradas del mercado en 2002 y las variedades que contenían el evento 176 también fueron retiradas y reemplazadas por productos más lucrativos (Sanahuja *et al.* 2011).

En 1998 la EPA aprobó una línea de tomate resistente a insectos (evento 5345) que expresaba Cry1Ac, y en 2001 la variedad de maíz Herculex (evento TC 1507) que expresaba Cry1F. En 2002 fue aprobado el algodón Bollgard II (evento 15985) de Monsanto que expresaba dos toxinas Bt, Cry1Ac y Cry2Ab, y después el YieldGard Rootworm (evento MON 863), que expresa una variante sintética del gen cry3Bb1 de Bt var. kumamotoensis. En 2003 fue liberada YieldGard Plus, la primera variedad "apilada" de Monsanto (eventos MON 810 + MON 863) que expresaba Cry1Ab1 y Cry3Bb1 y fue desarrollada mediante cruce de dos variedades Bt liberadas previamente (Sanahuja *et al.* 2011).

Aunque Estados Unidos ha adoptado entusiastamente la agricultura Bt y usa la mayor cantidad de terreno para cultivos Bt o Bt apilados, estos cultivos han sido adoptados y están incrementándose en otros 25 países, excepto en Europa. El área global dedicada a cultivos Bt en

2009 era de más de 50 millones de hectáreas (36% de todos los cultivos biotecnológicos), conformada por 21.7 millones de hectáreas de cultivos sólo Bt y 28.7 millones de hectáreas de cultivos Bt "apilados" con tolerancia a herbicidas (Sanahuja 2011).

Argentina y Brasil ocupan el segundo y tercer lugar global en agricultura Bt, pero China y la India han hecho la adopción más rápida; ambos son grandes productores de algodón y China lo es especialmente de arroz. Una serie de líneas de arroz transgénico transformadas con genes *cry1A*, *cry1Ab* y *cry1Ac* modificados fueron evaluadas en pruebas de gran escala en 2007 y aprobadas para su liberación comercial en 2009, aunque su cultivo en gran escala está pendiente (Sanahuja 2011).

Inmunidad en humanos expuestos a pesticidas Bt

Bernstein *et al.* (1999) evaluaron a jornaleros agrícolas expuestos y no expuestos directamente a la aspersión de suspensiones de esporas Bt pesticidas. Los trabajadores altamente expuestos fueron los que principalmente dieron pruebas cutáneas positivas a varios extractos de esporas, las cuales aumentaron significativamente meses después de la exposición inicial. Las pruebas cutáneas positivas también aumentaron significativamente en trabajadores con exposición baja o intermedia. La hibridación con sondas específicas de ácidos nucleicos demostró que la mayoría de los lavados nasales de trabajadores expuestos eran positivos para el organismo Bt comercial. Los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) e IgE específicos a los organismos Bt vegetativos fueron más frecuentes en el grupo de alta exposición, aunque en todos los grupos aparecieron anticuerpos IgG e IgE específicos. La atopias (alergias mediadas por el efecto de anticuerpos IgE) persistentes también fueron un factor de riesgo en los trabajadores con exposición intermedia y baja y pruebas cutáneas y serológicas positivas.

Alergias a los alimentos derivados de organismos transgénicos

La introducción de alimentos derivados de organismos transgénicos ha evidenciado los retos inherentes a la identificación de los alérgenos alimentarios y los individuos susceptibles.

Cualquier técnica para generar plantas puede modificar (aumentar o disminuir) la alergenicidad de los alimentos, pero la biotecnología tiene más potencial para introducir nuevas proteínas en la cadena alimentaria y por eso está sujeta a mayor escrutinio por las instancias regulatorias. Los comités de expertos han desarrollado algoritmos para la evaluación de riesgos de alergia por alimentos. Todos los aspectos de las evaluaciones actuales de alergia alimentaria, tanto las herramientas clínicas como las de laboratorio, representan desafíos técnicos que deben ser resueltos para introducir tales herramientas en el contexto regulatorio. Sin embargo, el principal reto científico es cómo evaluar las proteínas nuevas para las cuales no hay herramientas disponibles que permitan predecir los efectos de la exposición en la población general. Las experiencias con maíz StarLink y con cohortes ocupacionales expuestas a polvos de granos sugieren que el desarrollo de métodos post-comercialización puede servir para evaluar la salud ocupacional y de los consumidores. Por eso el algoritmo de la FAO/OMS para evaluar riesgos de alergias por alimentos debe ser revisado para incluir pruebas diagnósticas en los grupos de población susceptibles y afrontar los retos técnicos para evaluar las proteínas recién introducidas a la dieta (Bernstein *et al.* 2003).

Los genes *cry1Aa* y *cry1Ab* de Bt fueron los primeros en ser incorporados a semillas de maíz para aumentar su resistencia a insectos plaga. El gen *cry9c*, modificado para permitir que la proteína codificada persista en el intestino de las larvas, fue usado en la semilla del maíz StarLink. Aunque no se ha investigado la reactividad inmunológica cruzada entre las proteínas Cry1A y Cry9c, éstas comparten homología en 75% de las secuencias de amino ácidos conservadas e identidad en los dominios que determinan su estructura terciaria (Bernstein *et al.* 2003).

El maíz StarLink, producido por Aventis, fue aprobado por la EPA como pesticida para la alimentación de animales. En septiembre de 2000 se confirmó que StarLink había contaminado la provisión de los alimentos para humanos. La aprobación de StarLink sólo para animales se basó en su contenido de toxina Cry9c, la cual no podía ser excluida como alérgeno dada su mayor termoestabilidad respecto a otras proteínas Bt (Bernstein 2003).

Efectos crónicos y subcrónicos de los alimentos transgénicos sobre la salud

En todo el mundo están aumentando los efectos crónicos sobre la salud tales como cánceres y enfermedades hormonales, reproductivas, nerviosas o inmunológicas, incluso entre los jóvenes. Las pruebas de toxicidad subcrónica pueden generar hallazgos estadísticos significativos para prevenir estos efectos nocivos de las sustancias químicas, pesticidas, fármacos y organismos transgénicos sobre la salud de los mamíferos antes de su comercialización (Séralini *et al.* 2009).

Las pruebas regulatorias de toxicidad generalmente se hacen *in vivo* con ratas antes de comercializar productos de organismos transgénicos empleados para preparar alimentos o ser ingeridos directamente, así como pesticidas, fármacos y las sustancias químicas mejor probadas. La forma de aplicar las normas depende de comisiones formadas por las instancias regulatorias. Algunas pruebas nutricionales para mamíferos son realizadas en cerdos o vacas y pueden tener mayor duración aunque sea con pocos animales. Las pruebas de toxicidad subcrónica para la mayoría de los organismos transgénicos si acaso son realizadas en última instancia y sólo en ratas, con dos dosis en 10 animales. En contraste, los efectos de corto plazo de otros productos se miden en tres especies de mamíferos (Séralini *et al.* 2009).

Las llamadas pruebas crónicas (que duran más de tres meses) dan más oportunidad de revelar enfermedades metabólicas, nerviosas, inmunológicas, hormonales o cancerosas y son realizadas ampliamente para pesticidas, fármacos y algunas sustancias químicas pero no para la comercialización de los organismos transgénicos liberados al ambiente (1995-2009). Este enfoque es debatible porque casi todos los organismos transgénicos contienen residuos de pesticidas nuevos tolerados (como la soya Roundup Ready) o producidos (como los insecticidas Bt del maíz, que son toxinas proteínicas modificadas) (Séralini *et al.* 2009).

Séralini *et al.* (2007) aplicaron una metodología estadística apropiada para probar los efectos del maíz Bt sobre la salud de mamíferos. Las ratas alimentadas con maíz transgénico modificado por Monsanto (evento MON 863) fueron comparadas con sus controles isogénicos más cercanos y luego los seis grupos de referencia fueron alimentados con las diversas dietas basadas en maíz que Monsanto añadió al estudio.

Fueron recabados datos por órganos, dosis y momento de exposición a la dieta. También fueron estudiados los efectos de la composición de la dieta sobre el metabolismo de ratas sin maíz transgénico, comparando sólo los grupos control y de referencia entre ellos para evitar sistemáticamente la vinculación de estos efectos a la dieta transgénica. Monsanto no hizo este estudio estadístico en primera instancia y sólo tomó en cuenta los efectos en ratas alimentadas con maíz transgénico a la dosis más alta y en los demás grupos. Para aislar los efectos del proceso de transformación transgénica de las demás variables sólo es válido comparar el organismo transgénico (en este caso MON 863) con su isogénico equivalente no-transgénico, por lo cual el análisis de grupos de alimentos no relacionados confunde en lugar de aclarar el efecto del evento MON 863.

El fin del análisis estadístico es decidir si el consumo de organismos transgénicos no tiene efecto (hipótesis nula H_0 verdadera) o si (H_1 falsa) sobre la salud de las ratas. El análisis no debe reducirse al cómputo de una colección de valores de probabilidad. El rechazo estadístico de la hipótesis nula H_0 no implica que el efecto sea biológicamente significativo y la incapacidad para rechazar H_1 no significa que ésta es cierta. Por lo tanto, debe evaluarse la potencia de la prueba de las hipótesis, que depende del tamaño de la muestra y del diseño experimental, el nivel de significancia de la prueba y la magnitud del efecto (que puede ser considerado como biológicamente significativo). Este aspecto clave parece haber sido totalmente soslayado en el diseño experimental y en el informe estadístico de Monsanto sobre MON 863. Más aún, cualquier hipótesis estadísticamente no significativa es excluida sistemáticamente con este método reductivo. Este error inadvertido genera resultados falsos negativos y riesgos para la salud con consecuencias para millones de personas y animales (Séralini *et al.* 2007).

La berenjena transgénica y su moratoria en la India

El centro de origen y diversidad de la berenjena es la India, donde es un alimento de consumo masivo como el arroz en el Oriente y el maíz en México. El Comité de Aprobación de Ingeniería Genética de la India (GEAC) recomendó el 14 de octubre de 2009 la liberación comercial de la berenjena transgénica llamada "Bt brinjal", obtenida mediante selec-

ción de berenjenas modificadas genéticamente con un gen que codifica la proteína Cry1Ac.

Sin embargo, el 9 de febrero de 2010 el Ministro del Ambiente y Bosques (Minister of Environment and Forests, MoEF) del Gobierno de la India, en seguimiento de un proceso de consulta pública en siete ciudades, detuvo la recomendación del GEAC y declaró una moratoria por un periodo indeterminado.

El documento de la moratoria es un texto de 19 páginas que contiene las opiniones y respuestas del MoEF al proceso de consulta, así como opiniones selectas de varios grupos de interés incluidas en cuatro anexos de 532 páginas y está colocado en el sitio Web del Ministerio (www.moef.nic.in). Los anexos contienen un informe de las siete reuniones de consulta, cartas de los Ministros Jefes de los Estados, opiniones de científicos de la India y de otros países así como de individuos interesados y organizaciones de la sociedad civil.

Cotter (2005), Schubert (2009) y Fuentes (2010) advirtieron respectivamente sobre el riesgo potencial que representan el arroz, la berenjena y el maíz modificados genéticamente para expresar Cry1Ac e influyeron para que el Gobierno de la India detuviese la introducción y prohibiese la producción de berenjena Bt en su país. Sus argumentos se basan principalmente en las evidencias mencionadas, consistentes en la persistencia de los organismos vegetativos, la inducción de inmunidad sistémica y la aparición de alergias en trabajadores expuestos a la aspersión de preparaciones de esporas pesticidas Bt, así como a la inmunidad que la protoxina Cry1Ac recombinantes induce en ratones descubierta en México.

Los efectos inmunológicos de la protoxina Cry1Ac descubiertos por nuestro grupo parecen no haber sido comprendidos cabalmente, pues aunque influyeron para establecer la moratoria de la berenjena Bt en la India, también han sido citados para defender el consumo de plantas transgénicas que expresan proteínas Cry.

Tolerancia, patógenos adherentes y adyuvantes de mucosas

El tubo digestivo defiende de los efectos nocivos de toxinas, antígenos alimentarios y agentes infecciosos mediante factores innatos e inmunológicos específicos. Además de la integridad de la membrana mucosa y

de la digestión, numerosas células y mediadores inmunológicos específicos orquestan esos mecanismos defensivos. En el caso de los antígenos alimentarios el resultado usualmente es a favor de la tolerancia. Sin embargo, los defectos de esta barrera pueden llevar al desarrollo de respuestas inmunitarias aberrantes que incluyen reacciones alérgicas o de hipersensibilidad. La evidencia prevalente sugiere que la inmunidad saludable de las mucosas y un régimen de alimentación adecuado durante la infancia temprana están a favor de la tolerancia, aunque la predisposición genética y la carga de los alérgenos alimentarios facilitan el desarrollo de alergias (Chahine y Bahna 2010).

La mayoría de las muertes por infecciones son causadas por microorganismos patógenos adherentes que colonizan las superficies mucosas o se unen a ellas antes de atravesarlas y penetrar en el hospedero. Por eso una meta fundamental del diseño de vacunas es la inducción de inmunidad protectora duradera contra los patógenos adherentes de mucosas. Puesto que las vacunas aplicadas sobre las mucosas podrían ser administradas sin agujas, esto mejoraría su accesibilidad, seguridad y relación costo-eficacia. Los retos para la vacunación exitosa contra las infecciones por patógenos adherentes incluyen la pobre inducción de inmunidad en las mucosas, el escaso conocimiento de los mecanismos protectores y la disponibilidad de adyuvantes de mucosas —sustancias que potencian la respuesta inmunitaria de las mucosas contra los antígenos coadministrados con ellos— y sistemas de aplicación seguros y efectivos (Lawson *et al.* 2011).

Las enterotoxinas bacterianas elaboradas por *Vibrio cholerae* (toxina de cólera, CT) y la estrechamente relacionada toxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* han sido estudiadas extensamente y ejercen efectos adyuvantes excepcionales sobre las respuestas inmunitarias mucosas y sistémicas. Ambas toxinas pueden ser administradas por rutas mucosas o sistémicas e incrementar un amplio rango de respuestas inmunitarias, desde la producción de anticuerpos hasta la inmunidad celular por células T CD8 citotóxicas o CD4 efectoras. La estructura química de las proteínas de estas toxinas son bien conocidas y su actividad de ribosilación mediada por adenosín-difosfato (ADP) ha sido bien estudiada, aunque todavía no comprendemos cabalmente cuáles células y eventos moleculares están implicados en su función adyuvante (Lycke 2010).

La protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno y adyuvante de mucosas

Los siguientes párrafos describen cómo fue descubierta y caracterizada la actividad inmunogénica y adyuvante de mucosas de la protoxina Cry1Ac.

En la segunda mitad de la década de los noventa Roberto Vázquez-Padrón, entonces investigador del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, hizo una estancia en la ciudad de México para producir esporas de Bt en el Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). A poco de haber llegado me propuso —pues sabía que en mi laboratorio del Departamento de Biología Celular nos interesaba la inmunidad de las mucosas— explorar si el gen *cry1Ac* de una cepa de *E. coli* recombinante que traía consigo podría usarse para desarrollar vacunas de mucosas. Su idea era añadir al gen *cry1Ac* secuencias nucleotídicas adicionales que codificaran epítopos vacunales relevantes de patógenos adherentes para probar si la inoculación oral de cepas bacterianas transformantes que expresaran la protoxina con los epítopos adicionales inducían inmunidad protectora contra los patógenos correspondientes.

Sugerí a Roberto que primero deberíamos ser capaces de inducir inmunidad contra la protoxina Cry1Ac administrada intragástricamente a ratones y que la persona más competente para realizar estos experimentos era Leticia Moreno-Fierros, quien acababa de obtener el doctorado con una tesis sobre la inmunidad intestinal contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, el protozoario causante de la amibiasis.

Como esperábamos encontrar tolerancia absoluta a la administración intragástrica de la Cry1Ac recombinante, decidimos asegurar la respuesta inmunitaria intestinal contra ella coadministrándola por vía intragástrica junto con CT en un experimento con cuatro grupos de ratones: 1) control negativo (vehículo solo), 2) Cry1Ac sola, 3) CT sola, 4) Cry1Ac + CT. Aplicamos tres dosis a intervalos semanales (los días 1, 8 y 15) y el día 22 sacrificamos los ratones para titular los anticuerpos anti-Cry1Ac y anti-CT de las clases IgM, IgG e IgA en el líquido intestinal y el suero. Inesperadamente encontramos que la protoxina Cry1Ac es un inmunógeno de mucosas tan potente como CT, pues los títulos de anticuerpos anti-Cry1Ac de clase IgG e IgA en el líquido intestinal y el suero de los ratones inmunizados con Cry1Ac sola fueron tan altos como los títulos anti-CT. Por otra parte, los títulos de anticuerpos séricos anti-CT de los ratones que recibieron Cry1Ac + CT fueron ligeramente más

altos que los de los de ratones que recibieron CT sola, lo cual sugirió que *Cry1Ac* no sólo era inmunogénica sino que también parecía tener actividad adyuvante de mucosas (Vázquez *et al.* 1999).

Después confirmamos que la actividad adyuvante de mucosas de *Cry1Ac* es similar a la de CT para dos antígenos proteínicos coadministrados por vía intragástrica: seroalbúmina bovina y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, vacunalmente relevante (Vázquez-Padrón *et al.* 1999).

Luego demostramos la actividad adyuvante de mucosas para los polisacáridos de neumococos en los lavados traqueobronquiales de ratones inoculados intranasalmente con polisacáridos coadministrados o conjugados covalentemente con *Cry1Ac* (Moreno-Fierros *et al.* 2003)

Empleando un modelo experimental de meningoencefalitis en ratones por amibas de vida libre de la especie *Naegleria fowleri*, cuyo punto de evaluación final era la muerte de los animales retados con amibas vivas por vía intranasal, demostramos que la administración intranasal previa de *Cry1Ac* protege parcialmente y la coadministración con amibas fijadas protege totalmente del reto (Rojas-Hernández *et al.* 2004).

Los experimentos que prueban la inmunogenicidad y adyuvancia de mucosas de *Cry1Ac* fueron agudos; en ellos analizamos solamente la respuesta humoral específica de anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA contra la protoxina y las proteínas, polisacáridos y células enteras mencionados y no descartan que *Cry1Ac* también pueda causar alergias. Por otra parte, el grupo de Leticia Moreno demostró después que la protección contra la meningoencefalitis amibiana inducida por coadministración intranasal de *Cry1Ac* se acompaña de inducción de anticuerpos específicos de IgA secretoria (Jarillo-Luna *et al.* 2008).

Nuestros resultados implican que los anticuerpos anti-antígenos alimentarios potencialmente inducibles por la actividad adyuvante de la *Cry1Ac* liberada en el intestino por el consumo de alimentos transgénicos que contengan la protoxina —eventual, subcrónica o crónica según la frecuencia y magnitud del consumo individual— podrían afectar la absorción de los antígenos y tener efectos nutricionales a mediano y largo plazo.

Por lo tanto los argumentos de Cotter (2005), Schubert (2009) y Fuentes (2010) parecen quedarse cortos sobre el riesgo potencial de la presencia de *Cry1Ac* en los alimentos transgénicos, pues consideran solamente la inmunogenicidad relacionada con las alergias alimentarias pero no la actividad adyuvante que facilitaría la inducción de anticuerpos de clase IgA específicos para los antígenos alimentarios cuya absorción podrían bloquear con efectos nutricionales de mediano y largo plazo.

Conclusión: los alimentos transgénicos no deben tener actividad adyuvante de mucosas

La *Cry1Ac* ingerida con los alimentos transgénicos que la contengan y consumida de manera eventual, subcrónica o crónica, al ser liberada a la luz intestinal podría inducir inmunidad contra ella misma y alergias y su potente actividad adyuvante podría inducir inmunidad contra múltiples antígenos alimentarios y tener efectos nutricionales nocivos.

La autorización para comercializar alimentos transgénicos debería por tanto incluir pruebas agudas, subcrónicas y crónicas que descarten no sólo su alergenicidad e inmunogenicidad sino también su actividad adyuvante de mucosas para los humanos y los animales que pudieran consumirlos.

Los efectos tóxicos del glifosato y sus formulaciones comerciales

La rápida expansión de los cultivos transgénicos Roundup Ready Genéticamente Modificados (RR GM) ha provocado grandes incrementos en el uso del glifosato. Con frecuencia se afirma que este herbicida es seguro para el ser humano y para el medio ambiente. Sin embargo, recientes estudios científicos permiten poner en tela de juicio estas afirmaciones.

El glifosato...

Más de un 75% de los cultivos transgénicos cultivados este año en el mundo han sido diseñados para tolerar herbicidas con glifosato como principio activo, cuya fórmula más común es *Roundup*, nombre comercial de la compañía *Monsanto*, y cuya patente expiró en 2000.

La tecnología llamada RR se basa en generar cultivos resistentes a este biocida, donde todas las plantas mueren y sólo sobreviven las GM (genéticamente modificadas) RR. La soja RR GM es el cultivo transgénico que más se planta en el mundo, con 64 millones de hectáreas en 2009 (Antonioni *et al.* 2010). El glifosato es un herbicida total, no selectivo y de amplio espectro. Fue desarrollado para eliminación de hierbas y de arbustos, en especial los perennes. Su aplicación mata a las plantas debido a que suprime su capacidad de sintetizar aminoácidos aromáti-

cos. Es absorbido por las hojas y no por las raíces. Puede aplicarse en las hojas, inyectarse en troncos y tallos, o asperjarse a tocones como herbicida forestal. Los seres humanos y otros seres vivos pueden estar expuestos al glifosato si se encuentran en la zona de fumigación o en sus cercanías, o lo ingieren. Puede penetrar al organismo por vía oral, dérmica (piel) o inhalatoria (pulmones). Este y otros herbicidas basados en el glifosato consisten en una solución acuosa de una sal del mismo, un surfactante (ej POEA, muy tóxico), y otras sustancias adyuvantes. El glifosato se degrada principalmente a AMPA (aun más tóxico que éste).

..no es tan inocuo como lo pintan

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, EEUU, 1993) y la OMS (1997) clasificaron a los herbicidas conteniendo glifosato como "levemente tóxicos". Otra revisión en el 2000 (OMS) concluyó que "bajo las condiciones de uso presente y esperado, no hay potencial riesgo del herbicida *Roundup* en poner en riesgo de salud a humanos". Pero en dos ocasiones la EPA encontró falsificaciones deliberadas de los resultados de las pruebas realizadas en los laboratorios contratados por Monsanto para estudiar los efectos del herbicida. En 1996 Monsanto fue acusada de publicidad falsa y engañosa de los productos derivados del glifosato. En 2007, esta compañía fue declarada culpable de publicidad engañosa por presentar al *Roundup* como biodegradable y alegar que el suelo quedaba "limpio" después de su uso.

Queda claro entonces que de parte de la agroindustria no se presentan estudios científicos rigurosos acerca de la supuesta inocuidad del glifosato y sus formulaciones comerciales (véase por ejemplo Séralini *et al.* 2007 y Séralini *et al.* 2009). Hoy el *Roundup*, está clasificado por la UE como «peligroso para el medio ambiente» y «tóxico para los organismos acuáticos».

Además, muchos estudios científicos independientes recientes han mostrado que las formulaciones y productos metabólicos de *Roundup* interfieren con el ciclo normal celular (produciendo apoptosis, o muerte celular programada) y causan la muerte de embriones, placentas, y células humanas *in vitro* aún en bajas concentraciones (a veces a 10.000 veces menos que la concentración recomendada para su uso), (Marc *et al.* 2002; Richard *et al.* 2005; Benachour *et al.* 2007; Benachour *et al.*

2009; Koller *et al.* 2012, Mesnage *et al.* 2012). Estos estudios de científicos norteamericanos y franceses permiten clasificar al glifosato como un disruptor endocrino (Antoniou *et al.* 2010).

Una señal de alarma...

La región del Cono Sur americano, y en particular la Argentina suelen presentarse como ejemplos de desarrollo exitoso basados en la aplicación extensiva del modelo transgénico, que incluye fumigaciones masivas con glifosato. En 2009 se utilizaron 200 millones de litros de este herbicida sobre más de veinte millones de hectáreas cultivables en la República Argentina. (Antoniou *et al.* 2010).

Luego de diez años de aplicación cada vez más intensa de este modelo transgénico, comenzaron a acumularse reportes provenientes de zonas donde se fumiga masivamente con glifosato: informes sobre malformaciones provenientes de San Cristóbal y Malabrigo, provincia de Santa Fe, con índices de 12 malformaciones sobre cada 250 nacimientos, con casos similares ocurriendo en Monte Cristo, provincia de Córdoba; Las Petacas, Santa Fe; Ituzaingó, Córdoba, etc. En los últimos 10 años han aumentado un 300 % los casos de leucemias y linfomas en menores de 15 años y un 400% el número de malformaciones congénitas al momento del nacimiento.

... y la respuesta de un científico comprometido con la sociedad

Andrés Carrasco es muy conocido entre los biólogos moleculares que estudian el desarrollo embrionario. Este investigador y gestor científico argentino fue el primero en describir los genes con homeoboxes (*Hox*) en vertebrados (Carrasco *et al.* 1984). También es un ciudadano que gusta de reflexionar acerca de problemas comunes a todos nosotros, desde su perspectiva crítica e ilustrada (ver por ejemplo su blog en: http://www.myspace.com/andres_carrasco). En 2008, luego de enterarse de los reportes antes reseñados, —y ante el perverso paradigma imperante de tener que demostrar dentro de un laboratorio que la realidad existe— decidió aplicar sus modelos de experimentación (anfibios y pollos) al estudio de los posibles efectos teratogénicos del glifosato y *Roundup*. Los resultados

de su equipo (Paganelli *et al.* 2010) son tan claros como el título de su trabajo: "Los herbicidas a base de glifosato producen efectos teratogénicos al afectar la vía de señalización del ácido retinoico", en dosis de cientos a miles de veces menores que las utilizadas para fumigación.

El ácido retinoico

Es un potente morfógeno que actúa durante un corto y crítico período de tiempo durante el desarrollo embrionario (entre los días 20 a 35 durante la gestación del embrión humano). Se sintetiza endógenamente a partir de retinol mediante un par de oxidaciones secuenciales, que generan al compuesto activo ácido todo trans-retinoico (AR). Éste es capaz de unirse a sus receptores intracelulares heterodiméricos (RAR-RXR) y el complejo resultante actúa específicamente a nivel del ADN, regulando la transcripción génica. Algunos de los genes blanco de la acción de la vía de señalización del AR son, justamente, los mismos genes *Hox* que Carrasco descubrió hace 25 años, y que son responsables de generar y diferenciar a las diferentes partes del cuerpo a lo largo del eje antero-posterior. Otros (genes blanco del AR), actuando en las regiones más anteriores del embrión, son responsables de la neurogénesis, la formación de los ojos, así como de otras estructuras cefálicas.

Un exceso de AR durante el desarrollo embrionario tiende a transformar estructuras corporales anteriores en posteriores, y viceversa, así como provoca defectos en las estructuras medias del cuerpo (pudiendo producir ausencia de orejas, paladar fisurado, defectos en el Sistema Nervioso Central y hasta ciclopia), por lo que se desaconseja su administración durante el embarazo, dado su potencial carácter teratogénico.

Utilizando técnicas clásicas de la biología molecular del desarrollo (cultivo de embriones, microinyecciones, mediciones de actividad de genes reporteros, utilización de moléculas antagonistas, visualización de la expresión génica de genes marcadores por hibridaciones *in situ* e *in toto*, etc.) los investigadores demuestran que los herbicidas a base de glifosato y el propio herbicida alteran el patrón de expresión de genes marcadores de la cresta neural (*slug* y *krox-20*), la generación del patrón de rombómeros y la diferenciación neuronal primaria (visualizando el patrón de expresión de N-tubulina).

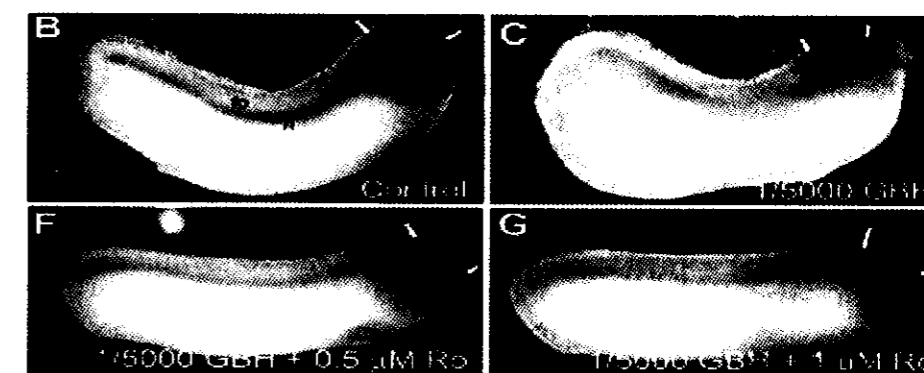
De cíclopes y microcéfalos

Dado que fueron observados defectos craneofaciales en niños recién nacidos en las áreas expuestas crónicamente a los herbicidas basados en el glifosato, se decidió explorar si la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la cabeza se alteraba como consecuencia del tratamiento con estos herbicidas o por microinyecciones con glifosato. Consistente con los resultados anteriores, estos tratamientos produjeron importantes defectos en la cabeza de los embriones de anfibios, afectándose la expresión génica de marcadores cefálicos (*pax6*, *sox9*, *shh/otx2*) y de la línea media dorsal (*shh/otx2*).

Los efectos encontrados hasta aquí, (similares a una sobreexposición al AR) hacían pensar que —bajo estas condiciones experimentales— podría estar afectada esta vía del AR, lo que fue confirmado mediante la utilización de un plásmido reportero RAREZ y del antagonista del AR llamado Ro 41-5253 (ver Fig. 1).

Todos estos efectos (de los herbicidas a base de glifosato y el propio glifosato) fueron probados asimismo en embriones de pollos, lo que

Figura 1

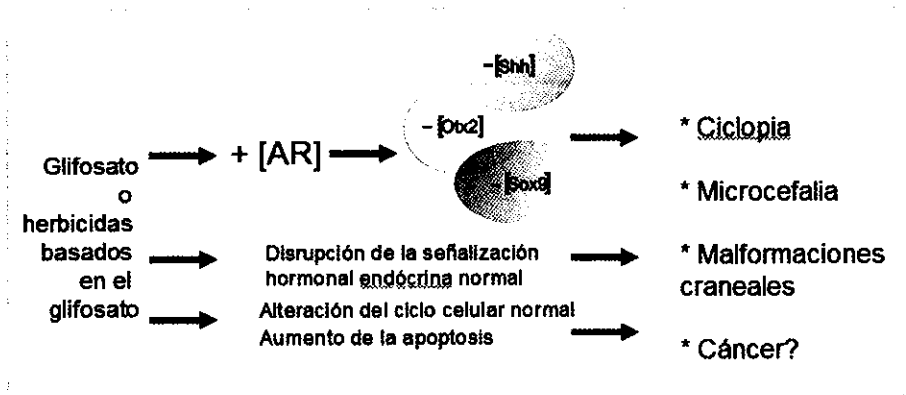


El fenotipo inducido por los herbicidas basados en glifosato (GBH) es mediado por un aumento de la señalización del Ácido Retinoico. Visualización de la expresión génica de genes marcadores (*shh* y *otx2*) por hibridaciones *in situ* e *in toto* en embriones de anfibios (*Xenopus laevis*). B) Embrión control (sin tratamiento). C) Embrión tratado con GBH diluido 5000 veces manifestando microcefalia y acortamiento del cuerpo. F,G) Embriones tratados como en C) con el agregado de diferentes cantidades de Ro (un antagonista del AR). Ro revierte el fenotipo producido por GBH, rescatando la elongación del eje antero-posterior y la expresión de *shh* y *otx2*. Extraído y modificado de Paganelli *et al.*, 2010.

extiende la validez del modelo experimental (Paganelli *et al.*, 2010). La conservación de la mecánica, regulación genética, especificación y determinación de territorios y poblaciones celulares durante el desarrollo embrionario a lo largo de toda la escala filogenética, ya bien establecida desde los años 80 con el descubrimiento de los programas génicos que dirigen a la morfogénesis (genes *Hox* y vías de señalizaciones inter e intracelulares), así como los avances en la interpretación de las bases evolutivas de los vertebrados, permiten inferir desde el principio de precaución de la ciencia médica que las alteraciones descritas son efectivamente extrapolables al desarrollo de cualquier organismo vertebrado, inclusive, claro está, el ser humano (Fig. 2).

Contrariamente a lo que afirma la agroindustria, la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) nunca autorizó a algún producto transgénico como seguro para la salud. Por el contrario, se han desregularizado a los alimentos transgénicos, determinando que son «sustancialmente equivalentes» a sus homólogos no transgénicos y que no requieren ninguna evaluación especial de seguridad. Sin embargo, el término «equivalencia sustancial» nunca ha sido definido científica o jurídicamente... Esta supuesta equivalencia se cae a pedazos cuando vastos sectores de la población aparecen afectados directamente por el cultivo de transgénicos. Si tenemos en cuenta que además estamos expuestos todo el tiempo

Figura 2



Efectos del glifosato o herbicidas basados en el mismo, de acuerdo a los estudios de Marc *et al.* 2002; Richard *et al.* 2005; Benachour *et al.* 2007; Benachour *et al.* 2009; Paganelli *et al.* 2010. +: aumento, -: disminución, []: concentración.

a la ingesta de glifosato a través de los alimentos preparados a partir de cultivos GM (quedan restos de glifosato en los granos de los cultivos fumigados —hasta 17 mg/kg en granos de soja, siendo el nuevo límite permitido de 20 mg/kg, y que Carrasco trabajó con dosis diez veces menores—) sólo resta esperar a ver en qué termina este experimento a escala global.

Un resultado frecuente de las malformaciones fetales es el aborto espontáneo, y —en las zonas expuestas al glifosato en la Argentina— no es infrecuente ver hasta cinco abortos espontáneos seguidos en una misma mujer. En marzo de 2010, una querrela impulsada por residentes de Santa Fe (Argentina) fumigados con glifosato, resultó en una prohibición, por parte de una corte regional, de aplicar glifosato cerca de las áreas pobladas en esa provincia argentina. Este fallo es muy importante, porque por fin se ha aplicado el principio precautorio y revierte el peso de la prueba, no son los pobladores los que deben probar la toxicidad del herbicida, sino el gobierno y los productores de transgénicos los que deben de probar que es “seguro”.

Referencias

- Antoniou, M., Brack, P., Carrasco, A.E., Fagan, J., Habib, M., Kageyama, P., Leifert, C., Nodari, R.O. y W. Pengue, (2010). Soja transgénica: ¿sostenible? ¿responsable?. En http://www.gmwatch.org/files/GM-soy_Sust_Respons_SUMMARY_SPA_v1.pdf.
- Benachour, N. y G.E. Séralini. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 97-105.
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C. y G.E. Séralini. (2007). Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, pp. 126-33.
- Bernstein, I. L., J. A. Bernstein, *et al.* (1999). Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ Health Perspect* 107(7), 575-82.
- Bernstein, J. A., I. L. Bernstein, *et al.* (2003). Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified foods. *Environ Health Perspect* 111(8), 1114-21.

- Bravo, A., S. S. Gill, *et al.* (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4), 423-35.
- Carrasco, A.E., McGinnis, W., Gehring, W.J. y E.M. De Robertis. (1984). Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell*, 37, 409-414.
- Cotter, J. (2005). *Genetically engineered Bt rice-food safety concerns and environmental dangers D. o. B. S. Greenpeace Research Laboratories*. Exeter EX4 4PS, UK: University of Exeter.
- Chahine, B. G. and S. L. Bahna (2010). The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance against allergy to food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10(3), 220-5.
- Fuentes, A. C. D. (2010). *Carta dirigida al Gobierno de México el 2 de marzo de 2010 en la que expone los argumentos de la carta del Dr. Schubert aplicados al maíz transgénico en México*, UCCS: <http://www.unionccs.net/article.php?story=argumentos-maiz-transgenico-mexico>.
- Jarillo-Luna, A., L. Moreno-Fierros, *et al.* (2008). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol* 30(1), 31-8.
- Koller, V.J. Fürhacker, M., Nersesyan, A., Misík, M, Eisenbauer, M. y S. Knasmueller (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol.*, DOI 10.1007/s00204-012-0804-8.
- Lawson, L. B., E. B. Norton, *et al.* (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol* 23(3), 414-20.
- Lycke, N. (2010). Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development?. *Expert Rev Vaccines* 9(12), 1357-61.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. y R. Bellé. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem Res Toxicol.*, 15, 326-31.
- Mesnage, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, A. y G.E.Séralini. (2012). Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac *Bt* insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J. Applied Toxicology*; DOI 10.1002/jat.2712.
- Moreno-Fierros, L., E. J. Ruiz-Medina, *et al.* (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant

- of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 57(1), 45-55.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L. y A.E. Carrasco. (2010). Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chem. Res. Toxicol.*, 23 (10), 1586-1595.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N. y G.E. Séralini. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives.*, 113, 716-20.
- Roh, J. Y., J. Y. Choi, *et al.* (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* 17(4), 547-59.
- Rojas-Hernandez, S., M. A. Rodriguez-Monroy, *et al.* (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 72(8), 4368-75.
- Sanahuja, G., R. Banakar, *et al.* (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9(3), 283-300.
- Schubert, D. (2009). *Carta dirigida al Ministro del Ambiente y los Bosques (Ministry of Environment and Forests) del Gobierno de la India el 18 de noviembre de 2009 por la introducción de la berenjena genéticamente modificada*, UCCS: <http://www.unionccs.net/article.php?story=argumentos-maiz-transgenico-mexico>.
- Seralini, G. E., D. Cellier, *et al.* (2007). New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Arch Environ Contam Toxicol* 52(4): 596-602.
- Seralini, G. E., J. S. de Vendomois, *et al.* (2009). How subchronic and chronic health effects can be neglected for GMOs, pesticides or chemicals. *Int J Biol Sci* 5(5), 438-43.
- Vazquez, R. I., L. Moreno-Fierros, *et al.* (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 49(6), 578-84.
- Vazquez-Padron, R. I., L. Moreno-Fierros, *et al.* (1999). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 64(21), 1897-912.