

# OGM: RISCHI E SICUREZZA



**Annalisa Paternò**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana  
Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM



## OGM:

- Possibili rischi per la salute umana e animale
- Possibili rischi per l'ambiente





## **Prima parte (gestione del rischio)**

- legislazione, normative europee e non
- EFSA

## **Seconda parte (valutazione del rischio)**

- possibili criteri per la valutazione del rischio
- metodiche usate e in via di sviluppo

## **Terza parte**

- il problema dell'antibiotico resistenza;
- allergie e OGM
- opinione dell'EFSA su un evento GM



## Struttura dell'analisi del rischio

### Valutazione del rischio

(risk assessment)

- su base scientifica

### Gestione del rischio

(risk management)

- strategie per prevenire e  
minimizzare il rischio

### Comunicazione del rischio

(risk communication)

*FAO/WHO, 1995*



## USA

### 3 principali organi

- USDA (United States Department of agriculture)
- EPA (Environmental Protection Agency)
- DHHS (Department of Health and Human Service),  
FDA (Food and Drug Administration)
  
- Non c'è nessuna normativa che richiede la registrazione di nuove varietà di piante
- Alimenti e mangimi derivati da piante GM sono regolati come la controparte non-transgenica



## ....CANADA, AUSTRALIA, GIAPPONE

### CANADA:

- Alimenti derivanti da OGM sono considerati novel foods; la Canadian Biotechnology Advisory Committee (CBAC) ha stilato delle raccomandazioni per la valutazione dei rischi

### GIAPPONE:

- Il Ministero della Salute e del Benessere si è occupato delle linee guida per la sicurezza di piante /alimenti GM

### AUSTRALIA:

- Il Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) si occupa della valutazione della sicurezza e provvede a possibili monitoraggi postmarket per alimenti derivati da OGM



## ....UNIONE EUROPEA

- La normativa dell' Unione Europea è più restrittiva
- L'opinione pubblica si è mostrata più scettica in merito agli OGM
- Nell'ambito europeo alcuni paesi, tra cui l'Italia, hanno sempre mantenuto una posizione più rigida per ciò che concerne l'introduzione di OGM



# LIBRO BIANCO

(documento che contiene proposte di azione comunitaria in un settore specifico)

Regolamento CE n.178/2002

- stabilisce i principi e i requisiti della legislazione alimentare
- istituzione dell' Autorità competente in ambito di sicurezza alimentare (EFSA)

## *Salute umana e animale*

- Regolamento CE n.258/97: Novel food (settore alimentare)
- Regolamento CE n.1829/2003: descrizione della procedura per l' autorizzazione; limiti di contaminazione (anche mangimi), etichettatura
- Regolamento CE n.1830/2003: tracciabilità; identificatore unico



## EFSA (European Food Safety Authority)

### Compiti dell'EFSA

- Fornire alle istituzioni europee e agli stati membri pareri riguardanti la sicurezza alimentare
- Promuovere e coordinare la messa a punto di metodi uniformi per la valutazione dei rischi
- Realizzare un'azione d'identificazione di caratterizzazione dei rischi emergenti
- Istituire delle reti europee di organismi attivi nel settore della sicurezza alimentare
- Fare in modo che il pubblico e le parti interessate ricevano un'informazione affidabile, obiettiva e comprensibile

*Regolamento CE n.178/2002*

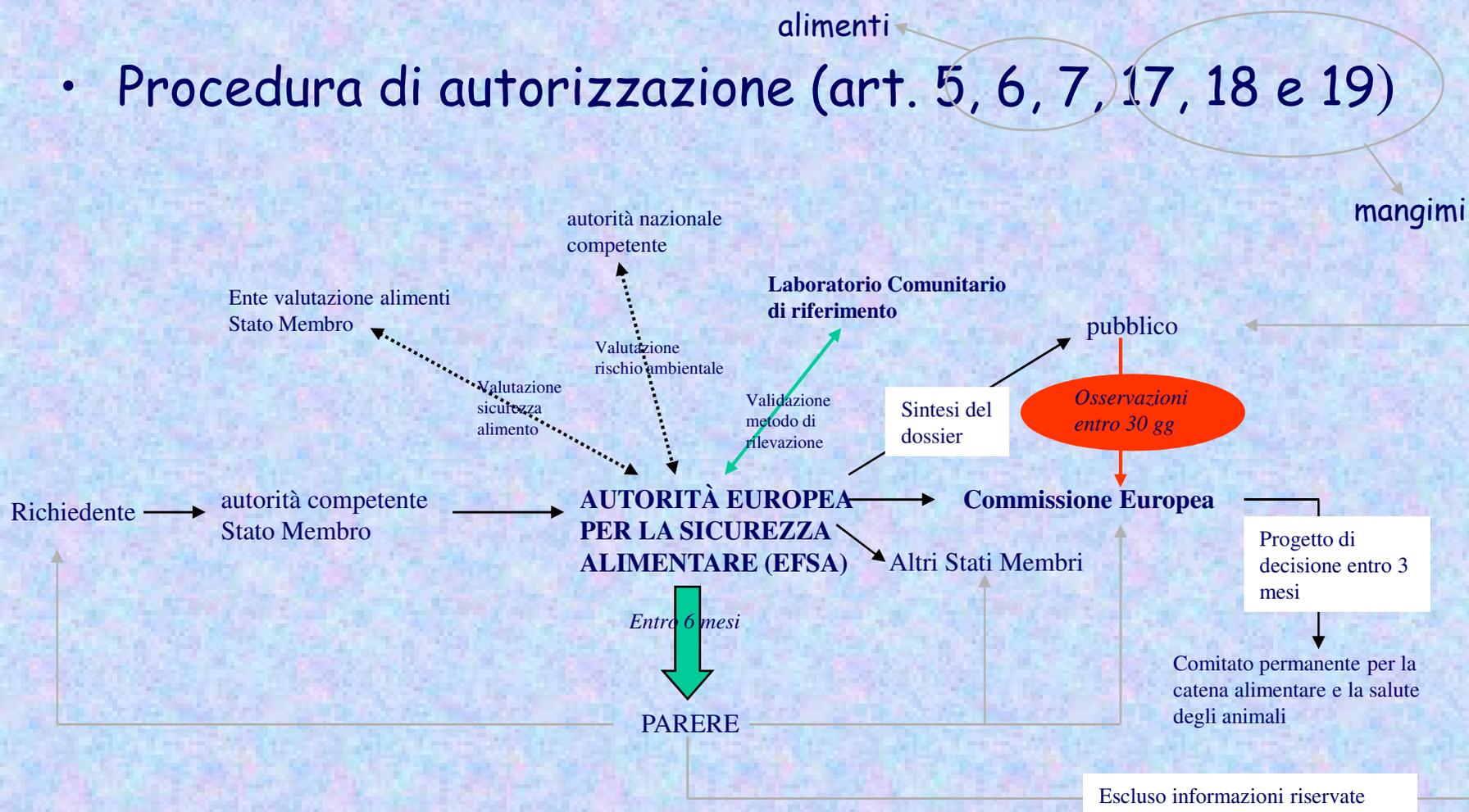
# STRUTTURA DELL'EFSA

- Il consiglio di amministrazione
- Il direttore esecutivo
- Il forum consultivo
- Il comitato scientifico
- **I gruppi scientifici:**
  - additivi, aromi e materiali a contatto con alimenti
  - prodotti o sostanze utilizzate in alimentazione umana
  - salute delle piante prodotti fitofarmaceutici
  - OGM
  - prodotti dietetici, alimentazione, allergie
  - rischi biologici
  - contaminanti della catena alimentare
  - salute e benessere degli animali



# Regolamento (CE) n° 1829/2003

- Procedura di autorizzazione (art. 5, 6, 7, 17, 18 e 19)





## Linee guida dell'EFSA per la valutazione del rischio in piante GM e alimenti e mangimi derivati

A) Analisi comparative delle caratteristiche molecolari agronomiche e morfologiche e della relativa composizione chimica

B) Eventuali test tossicologici e nutrizionali

Dovrebbero essere prese in considerazione:

- caratteristiche dell'organismo donatore e di quello ricevente
- il gene inserito
- L'espressione del gene inserito
- Potenziali conseguenze delle modificazioni genetiche
- Potenziale tossicità e allergenicità dei prodotti genici, dei metaboliti e dell'intera pianta
- la composizione nutrizionale
- l'influenza del processamento sulle proprietà degli alimenti
- il potenziale impatto nutrizionale sul consumo a lungo termine
- l'impatto ambientale a seguito del rilascio nell'ambiente

EFSA 2004



# Struttura dell'analisi del rischio



*FAO/WHO, 1995*

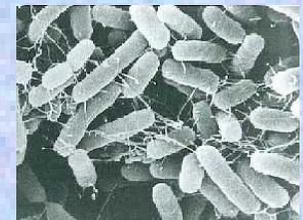
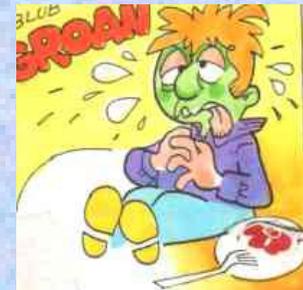
**RISCHIO:** in ambito alimentare è definito come il potenziale intrinseco di una sostanza di causare effetti dannosi alla salute umana

*FAO/WHO 1995*

Per gli OGM (e prodotti derivati)

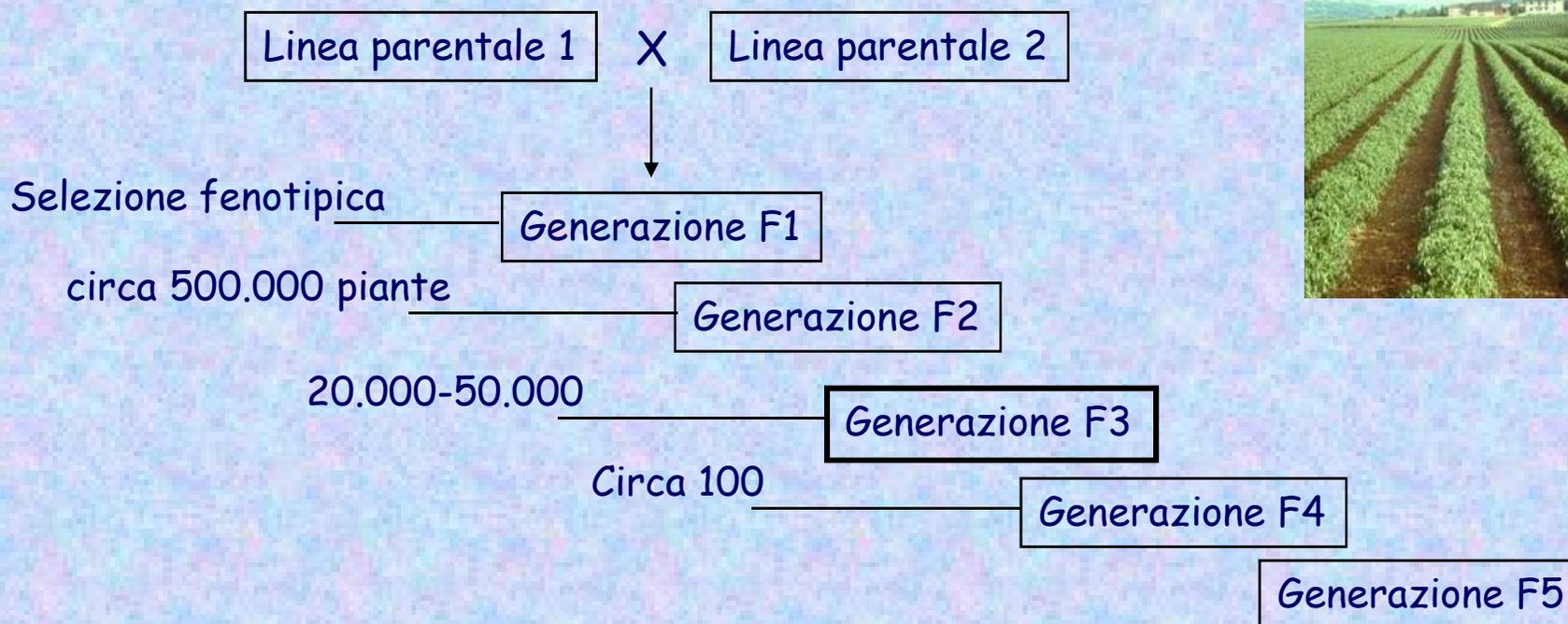
?

- Allergenicità
- Cambiamenti nutrizionali ed eventuali presenza di antinutrienti
- Possibilità di un trasferimento genico ai batteri o alle cellule di mammifero



# MIGLIORAMENTO GENETICO CONVENZIONALE

- Si sfruttano le variazioni genetiche naturali combinate alla selezione artificiale
- Meccanismo fondamentale: ricombinazione cromosomica



# INSERIMENTO DI DNA ESOGENO

In seguito all'inserimento di DNA esogeno in una pianta potremo avere:

- "effetti desiderati"
- "effetti non desiderati", cioè quelle differenze nel fenotipo, nella risposta e nella composizione della pianta GM rispetto a quella parentale non riferite al DNA introdotto



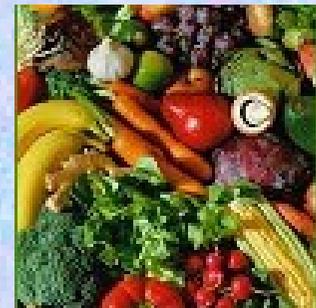


## “EFFETTI NON DESIDERATI”

- “Prevedibili”, che possono essere spiegati grazie alle nostre attuali conoscenze alla biologia delle piante e che sono correlati alle problematiche legate all'introduzione di DNA esogeno
- “Non prevedibili”

# EQUIVALENZA SOSTANZIALE

- La sicurezza degli alimenti tradizionali esistenti è data dal loro stesso utilizzo nel corso della storia
- La comparazione di una coltivazione/alimento GM e della sua più vicina controparte tradizionale non-GM, in teoria, permette di identificare eventuali differenze che vengono successivamente analizzate

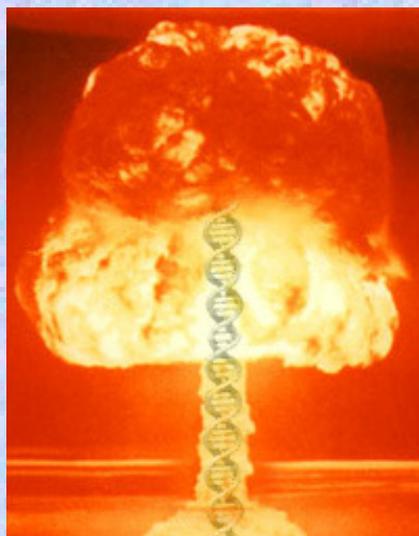




## SCELTA DI APPROPRIATI "COMPARATORI"

- La OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) ha preparato un documento indicando i composti chiave per la soia, la colza, la patata, la canna da zucchero, il mais e grano
- La conoscenza delle variazioni che "naturalmente" avvengono nella composizione dei metaboliti è molto importante

# ANALISI DEL RISCHIO



*Koning et al 2004*



# ANALISI DEL RISCHIO

•Descrizione della coltivazione **parentale**;  
•Scelta di parametri per il confronto

•Caratterizzazione del gene donatore, dell'evento di trasformazione

•Caraterizzazione del prodotto genico e dei metaboliti

•Valutazione di altre eventuali alterazioni, analisi complessiva

- **Caratteristiche agronomiche e fenotipiche**
- **Distribuzione geografica**
- **Storia della sicurezza d'uso**
- **Analisi della composizione chimica**

*Koning et al 2004*

# ANALISI DEL RISCHIO

•Descrizione della coltivazione parentale;  
•Scelta di parametri per il confronto

•Caratterizzazione del **gene donatore**, dell'evento di trasformazione

•Caratterizzazione del prodotto genico e dei metaboliti

•Valutazione di altre eventuali alterazioni, analisi complessiva

- Descrizione del vettore utilizzato
- Descrizione del processo
- Caratterizzazione del DNA introdotto
- Caratterizzazione del sito d'inserzione

# ANALISI DEL RISCHIO

•Descrizione della coltivazione parentale;  
•Scelta di parametri per il confronto

•Caratterizzazione del gene donatore, dell'evento di trasformazione

•Caraterizzazione del **prodotto genico** e dei metaboliti

•Valutazione di altre eventuali alterazioni, analisi complessiva

- **Struttura e caratterizzazione**
- **Modalità di azione e specificità**
- **Tossicità**
- **Allergenicità**

# ANALISI DEL RISCHIO

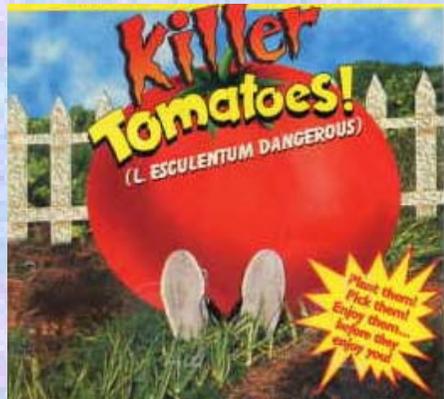
•Descrizione della coltivazione parentale;  
•Scelta di parametri per il confronto

•Caratterizzazione del gene donatore, dell'evento di trasformazione

•Caraterizzazione del prodotto genico e dei metaboliti

•Valutazione di altre eventuali alterazioni, **analisi complessiva**

- **Composizione nutrizionale**
- **Caratteristiche agronomiche**
- **Caratteristiche fenotipiche**



## TEST DI TOSSICITA'

- *Test in vitro* con enzimi, recettori proteici, linee cellulari
  - INVITTOX: banca dati corredata di test tossicologici *in vitro*
- *Test in vivo* sugli animali
  - si determina la NOAEL (no-observed-adverse-effect-level)
  - è molto difficile un apporto nutrizionale bilanciato utilizzando grosse quantità di alimenti derivanti da OGM

## APPROCCIO MIRATO (TARGETED APPROACH)

- E' basato sull'analisi qualitativa e quantitativa di composti bersaglio

Analisi su:

- Amminoacidi, acidi grassi, carboidrati
- Minerali

Particolare enfasi viene data ai nutrienti essenziali (vitamine), antinutrienti (per esempio inibitori della tripsina), composti tossici (per esempio glicocalcoloidi)



# Analisi di costituenti definiti



Table 2  
Demonstration of "substantial equivalence" by investigation of defined constituents

Plant	Genetic modification	Parameters
Canola	High laurate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amino acids</li> <li>• fatty acids</li> <li>• Erucic acid</li> <li>• glucosinolates</li> </ul>
Corn	Insect resistance (Cry I A(b))	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• Amino acids</li> <li>• fatty acids</li> <li>• Calcium, phosphorus</li> </ul>
Cotton	Herbicide tolerance (glyphosate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• Amino acids</li> <li>• fatty acids</li> <li>• Gossypol</li> <li>• <math>\alpha</math>-Tocopherol</li> <li>• Aflatoxins</li> </ul>
Cotton	Herbicide tolerance (bromoxynil)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amino acids</li> <li>• fatty acids</li> <li>• Gossypol</li> <li>• cyclopropenoid fatty acids</li> </ul>
Soybean	Herbicide tolerance (Roundup Ready glyphosate resistance)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• Fatty acids</li> <li>• Amino acids (phenylalanine, tyrosine, tryptophan)</li> <li>• Trypsin inhibitors</li> <li>• lectins</li> <li>• phytoestrogens</li> <li>• urease</li> <li>• stachyose, raffinose</li> <li>• phytate</li> </ul>
Potato	Herbicide tolerance (chlorsulfuron)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• Amino acids</li> <li>• valine, leucine, isoleucine</li> </ul>
Potato	Insect resistance (Cry III A)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• Glycoalkaloids</li> <li>• Vitamins B<sub>6</sub>, C</li> <li>• folic acid</li> <li>• Potassium</li> </ul>
Tomato	Insect resistance (Cry I A(b))	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proximate analysis</li> <li>• <math>\alpha</math>-Tomatine</li> <li>• Vitamin C</li> <li>• Minerals (Ca, P, Na, K, Mg, Fe, Cl)</li> </ul>
Tomato	Anti-sense polygalacturonase (Flavr Savr)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein</li> <li>• Tomatine</li> <li>• Vitamins A, B<sub>6</sub>, C</li> <li>• thiamine, riboflavin</li> <li>• Minerals (Ca, Mg, P, Na)</li> </ul>

# Effetti non desiderati per selezione del fenotipo o analisi costituenti definiti

Table 3

Demonstration of unintended effects by phenotype selection or investigation of defined constituents

Host plant	Trait	Unintended effect	Reference
Potato	Expression of bacterial levansucrase	Adverse tuber tissue perturbations	Turk and Smeekens (1999); Dueck et al. (1998)
Wheat	Expression of phosphatidyl serine synthase	Impaired carbohydrate transport in the phloem Necrotic lesions	Delhaize et al. (1999)
Soybean	Expression of glyphosate (EPSPS) resistance	Splitting stems and yield reduction (up to 40%) at high soil temperatures (45 °C) Higher lignin content (20%) at normal soil temperatures (20 °C)	Gertz et al. (1999)
Wheat	Expression of glucose oxidase	Phytotoxicity	Murray et al. (1999)
Rice	Expression of soybean glycinin	Increased Vit. B6-content (+ 50%)	Momma et al. (1999)
Potato	Expression of soybean glycinin	Increased glycoalkaloid content (+ 16-88%)	Hashimoto et al. (1999a); Hashimoto et al. (1999b)
Potato	Expression of yeast invertase	Reduced glycoalkaloid content (- 37-48%)	Engel et al. (1998)
Canola	Overexpression of phytoene-synthase	Multiple metabolic changes (tocopherol, chlorophyll, fatty acids, phytoene)	Shewmaker et al. (1999)
Rice	Expression of carotenoid biosynthetic pathway	Formation of unexpected carotenoid derivatives (beta-carotene, lutein, zeaxanthin)	Ye et al. (2000)



## ....LIMITI

- Si prendono in considerazione solo composti noti
- Non si considera l'organismo dal punto di vista complessivo

Nel caso in cui non abbiamo dei composti validi come confronto?



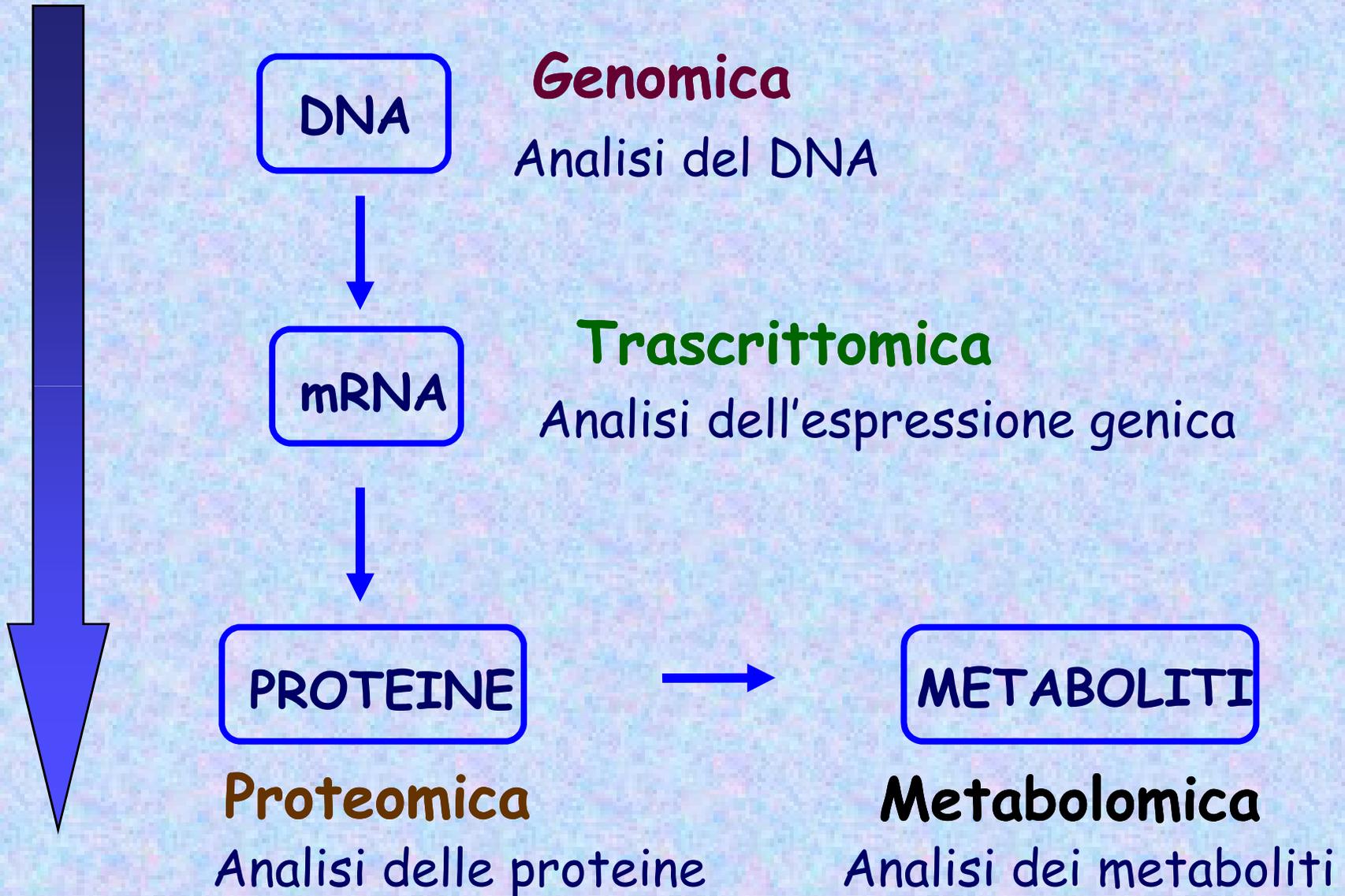
## APPROCCIO NON-MIRATO (NON-TARGET)

Si ottengono profili di comparazione di molti composti senza una conoscenza a priori della loro struttura e funzione; si utilizzano gli strumenti della:

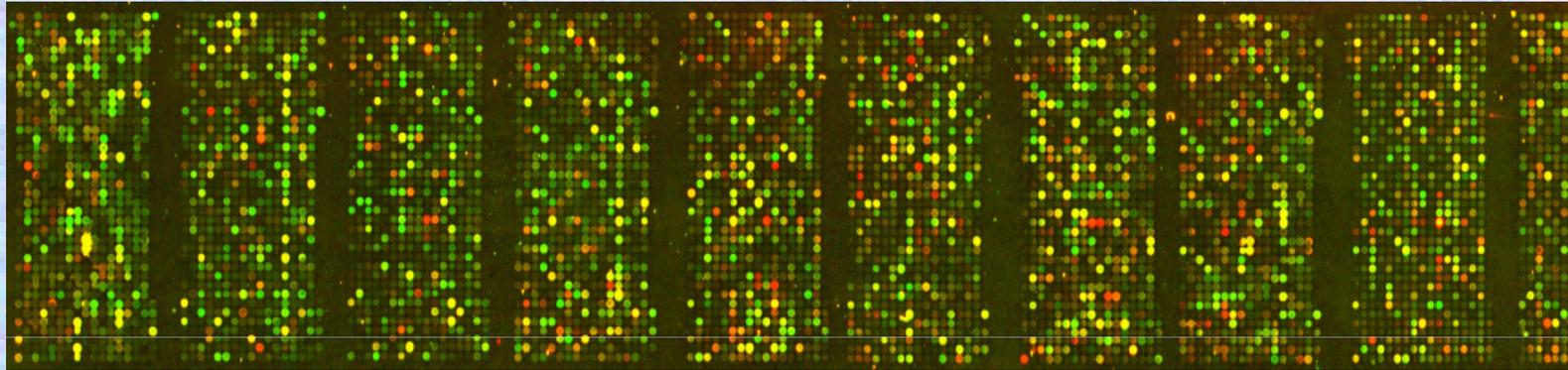
- Trascrittomica (analisi del profilo d'espressione)
- Proteomica (analisi delle proteine)
- Metabolomica (profilo di composti associati al metabolismo)



# LE -OMICHE



# TRASCRITTOMICA



**Microarray:** metodica che ci permette di analizzare l'espressione di un'enorme quantità di geni su uno stesso campione contemporaneamente

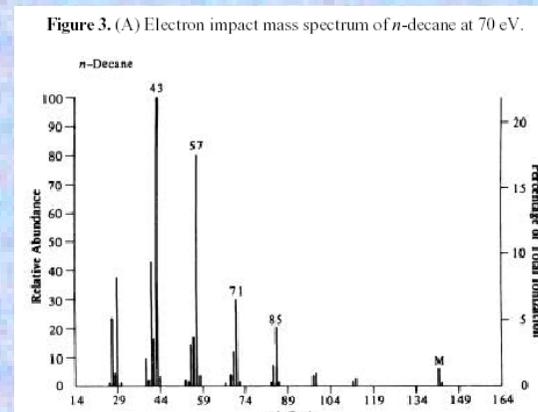
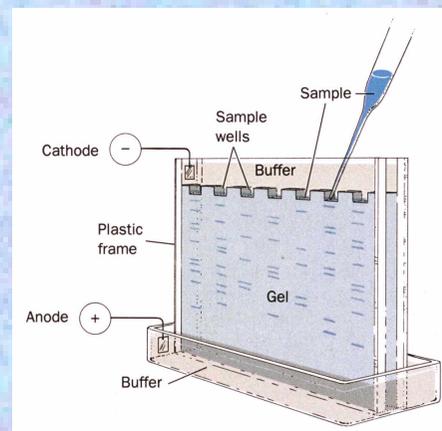
- confronto del profilo di espressione di una pianta GM e della controparte non-GM

# PROTEOMICA

Profilo proteico

Metodiche principali:

- Elettroforesi bidimensionale per separare le proteine presenti in un tessuto
- Spettrometria di massa per determinare l'identità delle proteine d'interesse

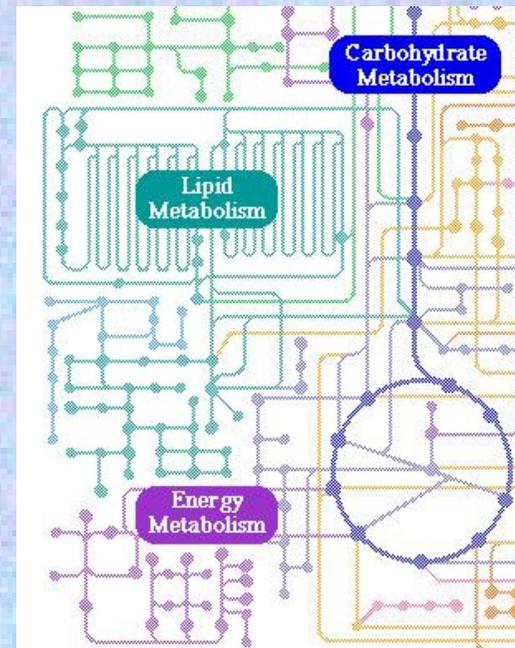


# METABOLOMICA

Collezione dei metaboliti presenti nella cellula e loro quantificazione

Metodiche principali:

- GAS cromatografia
- HPLC
- NMR



# POSSIBILITA' E LIMITI

- Grossa mole di dati
- Piccole variazioni possono influenzare il profilo di analisi complessivo
- Non è disponibile standardizzazione di metodiche





# ALCUNI PROGETTI DI RICERCA EUROPEI

**ENTRANSFOOD** (network europeo per la valutazione della sicurezza di coltivazioni GM destinate al consumo alimentare)

- **GMOCARE** (sviluppo di metodiche che coinvolgono proteomica, metabolomica...etc)
- **SAFOTEST** (sviluppo di protocollo per test *in vivo e in vitro*)
- **GMOMOBILITY** (analisi del trasferimento orizzontale di OGM alla microflora intestinale)
  
- **QPCRGMOFOOD** (tracciabilità degli OGM)
- **GMOCHIPS**



# LE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE E IL PROBLEMA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA



# GENI AR COME MARCATORI DI SELEZIONE

Due diverse fasi di selezione:

- Gene AR è utilizzato, nel vettore di clonaggio, per verificare la presenza del vettore nel ceppo batterico utilizzato
- Gene AR è utilizzato, sotto il controllo di un promotore della pianta, per selezionare le cellule vegetali trasformate





EFSA 2004



# CLASSIFICAZIONE DEI GENI AR

## Gruppo I

- Largamente distribuiti tra il suolo e batteri enterici
- Conferiscono resistenza agli antibiotici che hanno scarsa importanza terapeutica in medicina umana e veterinaria (*htp*, *ntpII*, *neo* : Hygromicina, kanamicina, neomicina)

*Non ci sono restrizioni per il loro utilizzo*



EFSA 2004



## Gruppo II

- Largamente distribuiti nei microrganismi e nell'ambiente
- Conferiscono resistenza agli antibiotici che sono usati solo come terapia in aree definite in medicina umana e veterinaria (*bla* *aadA*, *cat*: penicillina, streptomina, cloramfenicolo)

*L'uso di questi geni dovrebbe essere ristretto agli ambiti proposti*



EFSA 2004



## Gruppo III

Comprende geni AR che conferiscono resistenza agli antibiotici rilevanti per la terapia umana e veterinaria (*ntpIII*, *tetA*: amikacina, tetracicline)

*Dovrebbero essere evitato il loro utilizzo nella trasformazione di piante GM*



# IN CHE MODO POTREBBERO DIFFONDERSI I GENI AR?

## A: trasferimento genetico tra batteri

- Presenza del gene AR in un batterio
- Amplificazione del gene AR per moltiplicazione batterica
- Esposizione ad altri batteri
- Trasferimento del gene batterico AR ad altri batteri
- Incorporazione del gene batterico AR in un batterio ricevente
- Espressione dell'AR

## B: trasferimento genetico veicolato dalle piante ai batteri

- Presenza del gene AR in un batterio
- Trasformazione della pianta
- Rilascio del gene AR batterico dalle cellule vegetali GM all'ambiente o nel tratto gastrointestinale
- Esposizione ad altri batteri
- Incorporazione del gene AR in un nuovo batterio ricevente
- Espressione dell'AR



# ESPRESSIONE DEI GENI AR

- Il DNA contenente il gene AR deve essere il più possibile integro per poter essere inserito nel nuovo genoma
- Nel caso del DNA liberato dalle piante transgeniche, per potersi esprimere in un nuovo batterio dovrebbe avere un promotore e appropriati segnali di controllo batterici
- L'acquisizione di un nuovo tratto genetico dovrebbe essere associata ad un reale vantaggio selettivo per organismo ricevente

# GENI AR E ALIMENTAZIONE

Si osserva degradazione del DNA:

- Durante le fasi di lavorazione dell'alimento

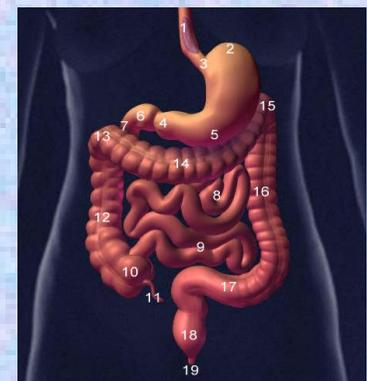


- Nell'assunzione del cibo e nel successivo assorbimento nel tratto gastrointestinale



# PROBABILITA' DI TRASFERIMENTO DEL GENE AR ALLA MICROFLORA INTESTINALE

- La quantità di DNA ricombinante assunto pro capite ( $0.049 \mu\text{g}/\text{giorno}$  di mais e  $0.011 \mu\text{g}/\text{giorno}$  di soia) è sicuramente sovrastimato (Jonas et al., 2001) a causa dei processi di lavorazione degli alimenti
- Solo una piccola percentuale raggiungerà il colon dove sono presenti un elevato numero di batteri



# CONCLUSIONI

- Attualmente il problema dell'antibiotico resistenza è dovuto principalmente al massiccio uso di antibiotici in terapia medica, piuttosto che al consumo di alimenti derivanti da OGM.
- Nonostante questo, l'uso di geni AR per la produzione di piante GM, destinate al consumo alimentare pone dei dubbi relativamente alla loro sicurezza d'uso

## MARCATORI DI SELEZIONE ALTERNATIVI

- introduzione di geni diversi dall'antibiotico resistenza, con cui poter attuare una selezione (per es: mannosio fosfato isomerasi)
- utilizzo di sistemi che implicano la rimozione dell'antibiotico resistenza

# LE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE E IL PROBLEMA DELL'ALLERGENICITA'





# REAZIONE AVVERSE AGLI ALIMENTI

- TOSSICHE (es: funghi velenosi, botulino...)
- INTOLLERANZE ALIMENTARI (deficienze enzimatiche, reazioni farmacologiche o cause ignote)
- **ALLERGIE:** - mediate da IgE  
- non mediate da IgE, ma da IgG



# ALLERGENI: CARATTERISTICHE GENERALI

- Proteine con struttura globulare compatta; spesso glicosilate
- Resistenti alla denaturazione nei processi produttivi ( trattamento con alte temperature)
- Resistenti alla digestione nell'apparato digerente (trattamento con pepsina, tripsina)

....ma non sempre!

# ALLERGENI PIU' IMPORTANTI

- LATTE VACCINO
- UOVA
- CROSTACEI
- ARACHIDI
- SOIA
- FRUTTA CON GUSCIO
- CEREALI

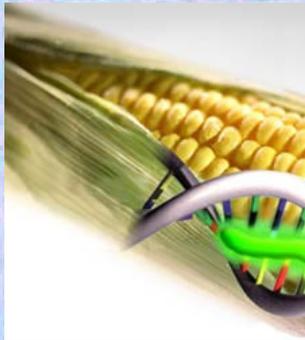
sono responsabili di  
circa il 90% delle  
allergie alimentari





# ALIMENTI GENETICAMENTE MODIFICATI

- Esempio di effetto indesiderato:  
introduzione nella soia del gene codificante per l'albumina 2S della noce brasiliana ricca in aa solforati
- Forte risposta allergica della proteina eterologa

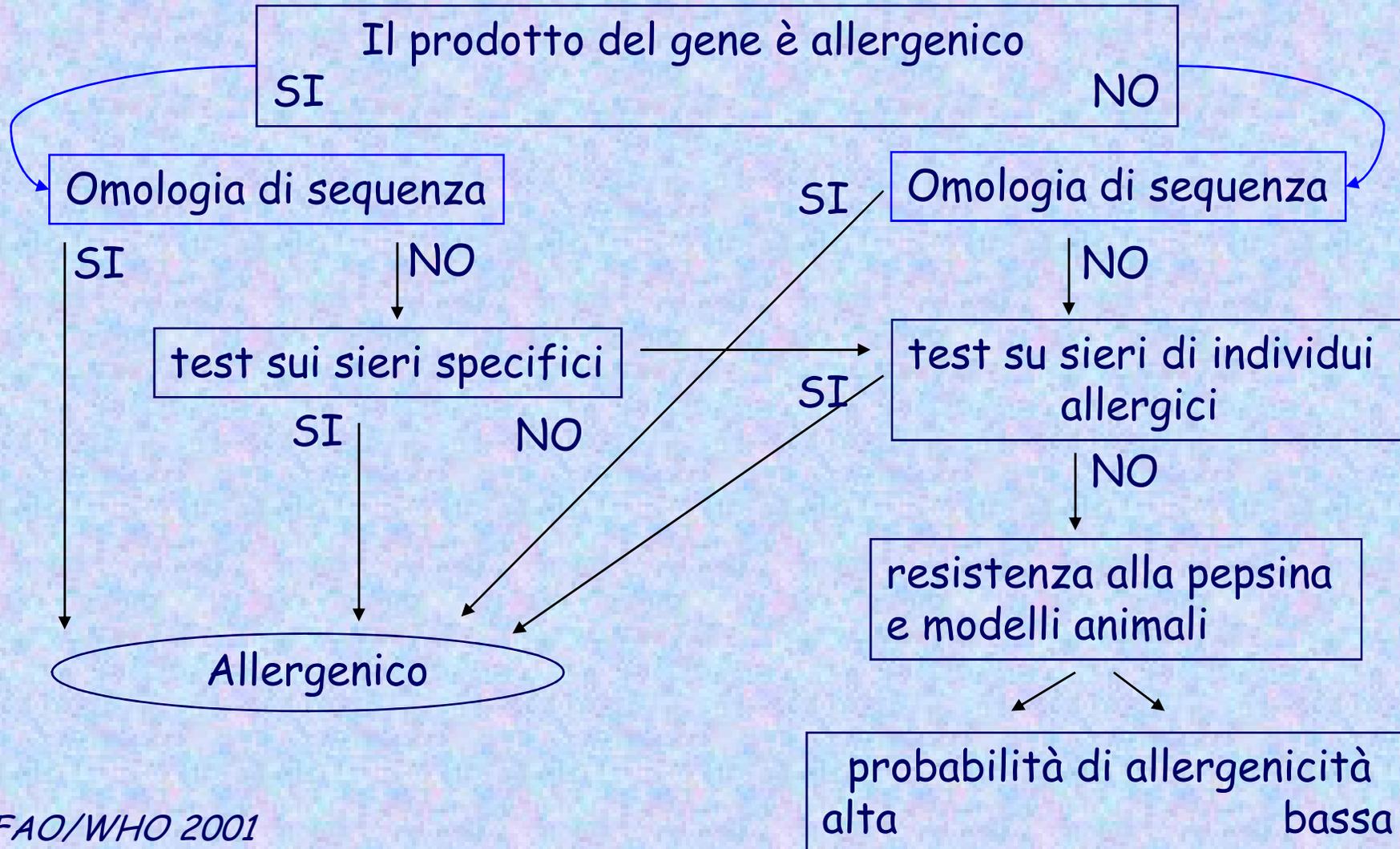


## IL CASO STARLINK

- MAIS transgenico (Aventis) che contiene la proteina cry9c (*bacillus turingensis*)
  - Proteina: resistente alle alte temperature; resistente al trattamento con tripsina
  - Per le suddette proprietà biochimiche non si può escludere un potenziale allergenico
- Destinato soltanto all'alimentazione animale e successivamente ritirato dal commercio



# VALUTAZIONE DEL POTENZIALE ALLERGENICO NEI NOVEL FOOD



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

