

Valutazione degli effetti intenzionali e non intenzionali derivanti dalla modificazione genetica

MARZIA DE GIACOMO
marzia.degiacomo@iss.it



Valutazione del Rischio: biotecnologie

- ❖ Dibattito nel 1990 =>
FAO, WHO, OECD, Nordic Council of Ministers,
ILSI
- ❖ Argomento: Come valutare i novel food compresi
gli alimenti biotech?
- ❖ Focus sull'ingegneria genetica e su "gli effetti non
intenzionali"

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Joint FAO/WHO Expert Consultation on Biotechnology and Food Safety

Rome, Italy, 30 September to 4 October 1996

- 1) Substantially equivalence
- 2) Substantially equivalence apart from certain defined differences
- 3) Not Substantially equivalence

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Effetti intenzionali /non intenzionali

Effetti intenzionali

- Gli effetti che rispondono agli obiettivi della modificazione genetica.

Effetti non intenzionali

L' effetto non intenzionale di per sé non è un problema sanitario.

Possiamo distinguere:

- quelli prevedibili a seguito dell'introduzione dell'inserito; (biologia della pianta, network metabolici);
- quelli inaspettati.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



BASI SCIENTIFICHE

Adottato 24 Settembre 2004

Aggiornato Dicembre 2005 (PMEM)

Pubblicato Maggio 2006

Aggiornato Dicembre 2006 (Rinnovo)

Marzo 2007 (Stacked events)

Last updated: 24 May 2011



GUIDANCE DOCUMENT OF THE SCIENTIFIC PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS FOR THE RISK ASSESSMENT OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS AND DERIVED FOOD AND FEED

Adopted on 24 September 2004
Updated on 7 December 2005
Final, edited version of 28 April 2006

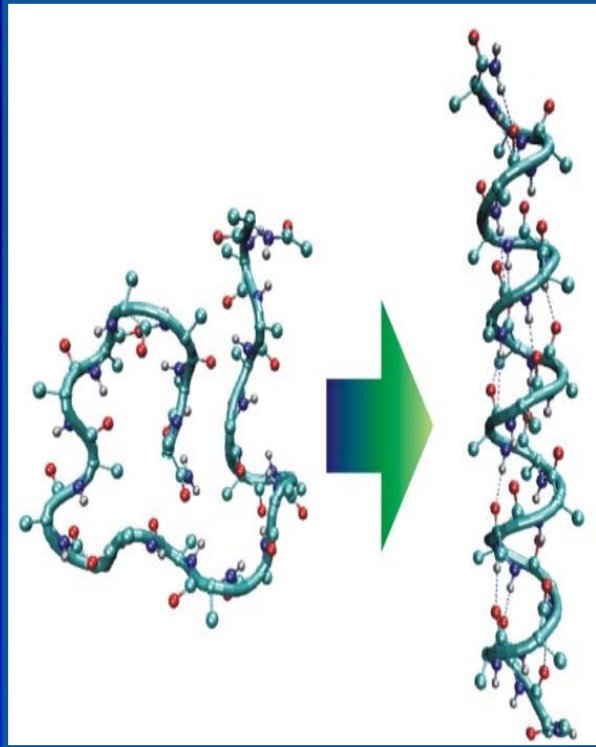
May 2006

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/99.htm>

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Biotecnologia applicata agli alimenti



- **PRINCIPLES FOR THE RISK ANALYSIS OF FOODS DERIVED FROM MODERN BIOTECHNOLOGY**
- **CAC/GL 44-2003** (Adopted 2003. Amendments 2008, 2011)
- The risk analysis process for foods derived from modern biotechnology should be consistent with the Codex Working Principles for Risk Analysis.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





EU

Sicurezza d'uso delle piante GM per il loro uso
come alimenti e mangimi

Si basa sul principio dell'equivalenza
sostanziale/comparative safety
assessment

IDENTIFICAZIONE DELLE DIFFERENZE e/o NON
EQUIVALENZA
TRA PIANTA GM E CONTROPARTE TRADIZIONALE

Requisiti per la controparte tradizionale non GM:

- ***storia consolidata di sicurezza d'uso (food safety)***
- ***familiarity (impatto ambientale)***

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



EQUIVALENZA SOSTANZIALE

- ❖ I concetti di familiarità e di equivalenza sostanziale furono sanciti nel 1993 dall' OECD e successivamente sviluppati da WHO/FAO nel 2000 come metodologia per la valutazione della sicurezza d'uso dei OGM.
- ❖ Il concetto di equivalenza sostanziale si basa sul presupposto che un organismo caratterizzato da tradizione di sicurezza alimentare, può essere utilizzato come elemento di paragone per la valutazione della sicurezza d'uso di alimenti e mangimi GM

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





Pianta GM

?

=



Controparte tradizionale

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Scelta del Comparatore

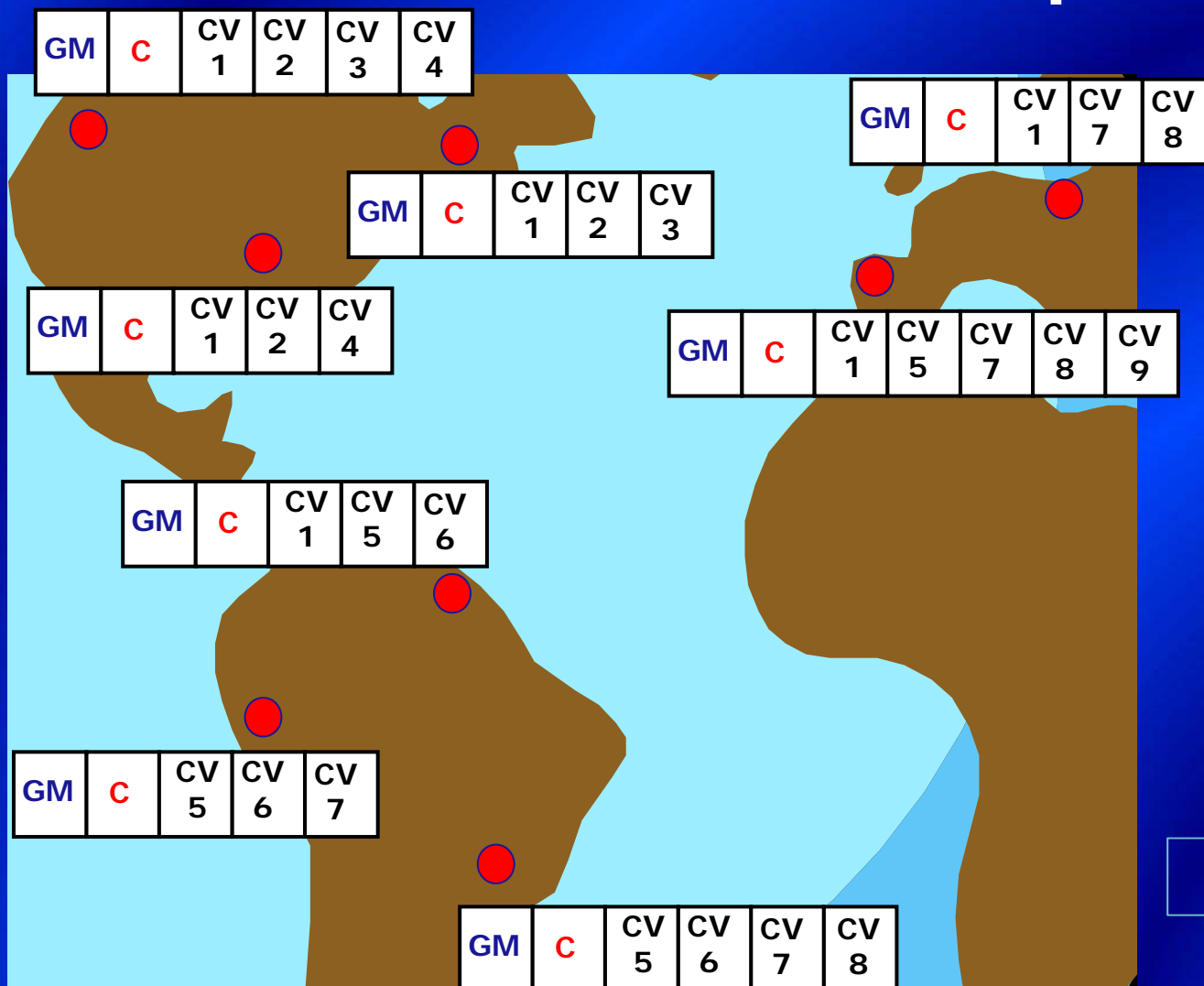
- **Controparte convenzionale:**
 - varietà isogenica non-GM (propagazione vegetativa)
 - genotipo più vicino possibile (propagazione sessuale)
- **Varietà di riferimento non-GM:** quelle presenti in campo necessarie a stabilire il range di variazioni naturali (test di equivalenza)

EFSA GD on selection of comparators (2011)

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



TRIALS IN CAMPO: requisiti minimi



EFSA FF GD (2011)

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Identificazione del pericolo
Analisi comparative con la controparte convenzionale:
analisi molecolare, composizionale, fenotipica ed agronomica

Caratterizzazione del pericolo

Differenze
intenzionali

Alterazioni comp/
nuovo gene

**Per cambiam.
multipli**

Differenze intenzionali

Alterazioni agronomiche
e comp.

**Valutazione della sicurezza
solo del tratto inserito**

Tossicità invivo/vitro,
allergenicità, bioinformatica

**Valutazione di sicurezza
dell'intero
alimento/mangime**

Feeding trials a 90 gg su
roditori/ su animali da
allevamento

Valutazione dell'esposizione

Caratterizzazione del rischio

CONCLUSIONI SULLA SICUREZZA

valutazione comparativa della sicurezza d'

Il primo step di questo approccio è l'analisi delle caratteristiche molecolari, agronomiche morfologiche e relative alla composizione chimica dell'OGM basata sul confronto tra OGM e la sua controparte tradizionale coltivata nelle stesse condizioni agronomiche ed ambientali.

L'analisi comparativa permette di identificare eventuali differenze tra la pianta OGM e non OGM differenze su cui si basa la successiva valutazione.

La valutazione può prevedere successive analisi nutrizionali e tossicologiche specifiche al fine di dimostrare che la pianta GM ed i suoi prodotti derivati sono sicuri come la controparte tradizionale.

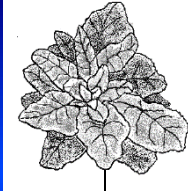
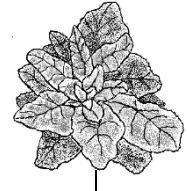
I trials in campo sono fondamentali per valutare le differenze tra pianta GM e/o prodotti derivati e comparatore e/o equivalenza con varietà non-GM di riferimento con storia consolidata di sicurezza d'uso.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015

Approccio metodologico caso per caso implementato in fasi successive



GM crop



Non-GM crop

molecular characteristics genotype composition phenotype

identification of differences

inserted genes expressed proteins metabolites whole foods

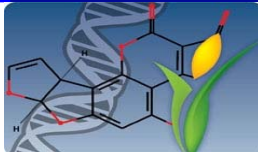
decision on further testing

gene transfer Allergenicity, toxicity toxicity toxicity

Estimation of actual consumer's exposure to hazards

Risk Assessment of GM food crops

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Analisi composizionale (1)

- L'analisi dovrebbe essere effettuata sul prodotto agricolo non processato.
- I composti da analizzare dovrebbero essere selezionati in accordo con il Consensus Document dell'OECD (considerazioni composizionali su nuove varietà di piante)

☐ **umidità, proteine, lipidi, carboidrati, ceneri, macro e micro nutrienti, composti anti-nutrizionali, tossine naturali ed allergeni.**

☐ **metaboliti caratteristici della specie analizzata.**



Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





Analisi composizionale (2)

Per una appropriata valutazione della sicurezza d'uso, potrebbero essere richieste analisi specifiche sulla base dell'effetto intenzionale della modificazione, del valore nutrizionale e dell'utilizzo della pianta

- ❖ **Profilo degli acidi grassi (piante ricche di oli).**
- ❖ **Profilo amminoacidico (piante come fonte proteica).**
- ❖ **Analisi di composti specifici, inclusi metaboliti di vie metaboliche potenzialmente modificate.**

Se l'organismo ricevente è un noto allergene, si dovrà testare l'eventuale cambio in allergenicità dell'intero alimento modificato comparandolo al set di allergeni del suo appropriato comparatore.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



STRUTTURA CONSENSUS DOCUMENTS

- Background- usi, processamento, breeding
- Nutrienti: proteine, lipidi, amino acidi, acidi grassi, minerali ecc.
- Altri costituenti: Anti-nutrienti, Tossine, Allergeni, altri metaboliti delle piante
- Costituenti da analizzare relativamente all'uso come alimenti.
- Costituenti da analizzare relativamente all'uso come mangimi

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Suggested parameters to be analysed for maize for food use

Parameter	Oil	Starch	Grits/Meal/ Flour	Kernels (Field maize, Sweet maize, Popcorn)
Proximate analysis ^a		X	X	X
Minerals				X
Vitamins				X
Amino acids			(X)	X
Fatty acids	X		X	X
Phytic acid				X
Raffinose				X
Furfural				X
Ferulic acid				X
p-coumaric acid				X

a: Proximate includes protein, fat, total dietary fibre, ash and carbohydrates

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Suggested parameters to be analysed for maize for feed use

Parameter	Kernel	Silage
Proximate ^a	X	X
Amino Acids	X	
Fatty Acids	X	
Calcium	X	X
Phosphorus	X	X
Phytic Acid	X	

a: Proximate includes protein, fat, total dietary fibre, ash and carbohydrates

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





Caratterizzazione Agronomica e Fenotipica

Anche gli aspetti relativi alla biologia della pianta dovrebbero essere valutati:

- ✓ **Resa, morfologia della pianta, tempo di fioritura, grado di maturazione, yield, vitalità del polline, risposta della pianta ai patogeni e agli insetti nocivi, sensibilità agli stress abiotici (freddo, caldo, carenza idrica).**

Differenze agronomiche tra pianta GM e comparatore, al di là dell'effetto intenzionale, potrebbero fornire indicazioni sugli effetti non intenzionali, valutabili tramite caratterizzazione molecolare e composizionale.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Effetto del Processamento

- ❑ Dovrebbe essere valutato se le tecniche di processamento applicate hanno in qualche modo modificato le caratteristiche del prodotto finito, sempre in relazione alla sua controparte.
- ❑ Una modificazione genetica a carico di una via metabolica, potrebbe determinare cambiamenti a livello di concentrazione dei costituenti e produzione di nuovi metaboliti.
- ❑ Prodotti processati derivanti da tali piante GM potrebbero richiedere approcci specifici per la valutazione del rischio.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Effetto del Processamento (2)

Nel caso in cui la pianta GM contenga nuovi composti, si dovrebbe valutare l'effetto del processamento su tali composti.

Altri aspetti:

- L'impatto del processamento sull'aumento e/o la diminuzione dei livelli di composti specifici.
- Formazione di nuovi composti dovuti al processamento.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





STACKS

Piante GM che ospitano la combinazione di più eventi di trasformazione, ottenuti in molti casi da breeding convenzionale.

La valutazione del rischio ha lo scopo di:

- **Stabilire che la combinazione sia stabile**
- **Identificare le interazioni tra eventi che potrebbero determinare un effetto avverso.**

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015





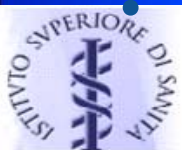
Analisi Statistica

L'analisi statistica segue due approcci:

- ❖ **Un test della differenza** per verificare se la pianta GM è diversa dal suo comparatore e quindi potenzialmente essere considerata un pericolo (rischio potenziale)
- ❖ **Un test della equivalenza** per verificare se la pianta GM è equivalente o no alle varietà non-GM con una storia consolidata di sicurezza d'uso.

Valutazione della rilevanza biologica delle differenze e/o non equivalenze

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Le conclusioni della valutazione comparativa dovrebbero chiaramente evidenziare se:

- Ci sono differenze composizionali tra pianta GM e suo comparatore;
- Ci sono differenze agronomiche e fenotipiche tra pianta GM e suo comparatore. In tal caso, si dovranno prendere in considerazione le variazioni naturali.
- Ci sono indicazioni di interazioni tra eventi combinati in piante con eventi stacked.

Nel caso in cui la valutazione comparativa non sia applicabile si procederà con una valutazione completa nutrizionale e della sicurezza della pianta e dei prodotti derivati.

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Regulation (EU) No 503/2013 on applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No 1829/2003

- **90 day feeding study with whole food/feed** mandatory for all single events
 - A review of this requirement is foreseen by 2016. The Commission will perform this review based on new scientific information such as the outcome of the EU project GRACE (GMO Risk Assessment and Communication of Evidence) (see Art. 12, IR 503/2013).
- **re-sequencing of DNA inserts and their flanking regions** in GM plants containing stacked events
 - To be compared with the nucleotide sequence of the respective single events
- **Quantitative measurement of allergens** in the frame of compositional analysis as referred to in relevant OECD documents

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Allergenicità

Particolare attenzione deve essere posta nella valutazione della possibile allergenicità del prodotto. I principali approcci a tale determinazione possono essere così riassunti:

- ❑ Origine del materiale genetico trasferito (verifica della presenza di allergeni nella specie di origine)
- ❑ Peso Molecolare (nella maggior parte degli allergeni noti oscilla tra 10.000 e 40.000)Kda
- ❑ Omologia di sequenza (confronto con banche dati contenenti le sequenze aminoacidiche di allergeni noti)
- ❑ Stabilità al riscaldamento e ai processi tecnologici di trasformazione (gli allergeni alimentari sono di solito termoresistenti)
- ❑ Effetto del pH e/o dei succhi gastrici (gli allergeni alimentari sono di solito resistenti all'acidità gastrica) e alle proteasi digestive

EFSA FF GD (2011) + EFSA allergenicity opinion (2010)

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Example

- Plant : GM-maize
- Control + 3 commercial maize each site
- 5 sites with 3 replicates
- 77 components – 9 forage and 68 in grain
- Grown in USA and Argentina

Analisi del rischio di alimenti e mangimi geneticamente modificati Roma, 25-26 febbraio 2015



Example: Summary of the statistical differences for the compositional comparison USA

Tissue/Site/ Component (Units)	Mean GMO maize	Mean Control	Mean Diff. (% of Control Value)	Signif. (p-value)	GMO maize (Range)	99% Tolerance Interval
combined site (5 sites; 61 components)						
Mineral						
Forage Phosphorus	0.25	0.21	19.24	0.010	(0.22-0.32)	[0.071, 0.32]
Fatty acid						
Grain 18:0 Stearic (% total fa)	1.89	1.82	3.97	0.002	(1.79-2.03)	[0.86, 2.98]
Grain 20:0 Arachidic (% total fa)	0.39	0.38	3.43	<0.001	(0.36-0.42)	[0.23, 0.54]
more than on site						
Proximate						
Site IA Grain Carbohydrates (% dw)	83.38	84.52	-1.34	0.008	(83.29-83.55)	[81.08,88.80]
Site OH Grain Carbohydrates (% dw)	84.26	83.80	0.55	0.009	(83.99-84.59)	[81.08, 88.80]

Practical examples

- Identification of potential unintended effects
- Example taken from recently adopted EFSA opinions or publicly available summaries of applications under Regulation 1829/2003
 - **Insect-resistant GM maize MIR604**

Insect-resistant GM maize MIR604

- Maize MIR604 was engineered with a modified cry3A coding sequence (mcry3A) derived from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* that encodes an insecticidally active mCry3A protein
- In addition maize MIR604 was engineered with the *pmi* (*manA*) gene from *E. coli*, which encodes the enzyme PMI (PhosphoMannose Isomerase) as a selectable marker. PMI allows transformed maize cells to utilize mannose as a sole carbon source, while maize cells lacking the *pmi* gene fail to grow with mannose as single carbon source.



Insect-resistant GM maize MIR604

- Molecular characterization
 - PMI catalyses the conversion of mannose-6-phosphate to fructose-6-phosphate and vice versa, and these two compounds are the only known substrates of PMI enzymes.
 - This has been further confirmed by a study in which various saccharides were incubated with PMI-0105, the bacterially produced analogue of the newly expressed PMI in maize MIR604. No reaction occurred when fructose-1,6-diphosphate, mannose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose, or mannose were added as substrates.

Insect-resistant GM maize MIR604

- Compositional analysis
 - The EFSA GMO Panel also considered the possibility that the expression of the PMI enzyme interfered with the formation of downstream metabolites of mannose-6-phosphate and fructose-6-phosphate, including glycans attached to glycoproteins. The applicant provided further evidence that a PMI-producing maize did not show any changes in the electrophoretic profiles of glycoproteins

Insect-resistant GM maize MIR604

- Compositional analysis
 - In compounds that could theoretically be linked to PMI (e.g., starch and other carbohydrates), no consistent compositional differences were observed in the comparison between maize MIR604 and its non-GM comparators
 - An analysis of monosaccharides and disaccharides, and their phosphorylated forms, was carried out on kernels of maize MIR604 and its non-GM comparators. No statistically significant difference were observed

Insect-resistant GM maize MIR604

- Conclusion
 - Based on the results of the comparative analysis of samples from a representative range of environments and growing seasons, it is concluded that maize MIR604 is compositionally, phenotypically and agronomically equivalent to conventional maize, except for the presence of the PMI and mCry3A proteins in maize MIR604

marzia.degiacomo@iss.it

GRAZIE!

