

Cuprins

Prefață	5
Introducere	8
1. Interacțiunea OMG cu mediul ambiant	10
2. Consecințele utilizării bio-tehnologiilor agricole	13
2.1. Agricultura ecologică.....	13
2.2. Biopesticide.....	15
3. Consecințele aplicării ingineriei genetice în industrie	15
3. 1. Industria Chimică.....	16
4. Impactul OMG asupra sănătății publice	18
4.1. OMG - declanșatorii alergiilor	19
4.2. Proteine legate de patogeneză	27
4.3. Modificarea toxicității plantelor.....	32
4.4. Rezistența indusă la antibiotice	41
5. Aportul benefical utilizării OMG.....	48
5.1. Agricultura și industria alimentară.....	49
5.2. Industria farmaceutică.....	57
Încheiere	65
Bibliografie	67



PREFAȚĂ

Problema privind diversitatea biologică constituie una din principalele preocupări ale omenirii în Mileniul III. Problema constă în faptul, că odată cu avansarea progresului tehnologic și utilizării intensive a resurselor naturale a sporit considerabil impactul antropic asupra diversității biologice, diminuând esențial numărul speciilor și varietăților de organisme vii care populează Globul Pământesc. Această situație critică a pus în gardă comunitatea internațională și societățile civile din multe țări. În rezultatul discuțiilor la nivel înalt a fost elaborată Convenția privind diversitatea biologică, deschisă pentru semnare la conferința Națiunilor Unite pentru Mediu și Dezvoltare la 5 iunie 1992 la Rio de Janeiro, și care a intrat în vigoare la 29 decembrie 1993. Convenția are ca obiectiv principal protecția, conservarea și utilizarea durabilă a diversității biologice.

Una din întrebările abordate de Convenție este securitatea biologică. Sistemul de Biosecuritate vine să protejeze sănătatea umană și a mediului de efectele adverse posibile cauzate de rezultatele biotehnologiilor moderne. În același timp, e bine cunoscut faptul că biotehnologiile moderne au un potențial considerabil pentru promovarea bunăstării umane, în particular, pentru depășirea necesităților critice în alimentație, agricultură și sănătatea umană. Convenția recunoaște în mod deschis aceste aspecte ale biotehnologiei moderne.

Începând cu anii 60 ai secolului trecut s-au dezvoltat cercetările științifice în domeniul biotehnologiilor, care au căpătat un aspect aplicativ în anii 80, odată cu acceptarea pentru cultivare a plantelor modificate genetic. Din acest moment au apărut discuții în cercurile academice și societatea civilă asupra beneficiilor și riscurilor posibile rezultate din utilizarea organismelor modificate genetic (OMG) asupra mediului și sănătății umane.

Astfel, la 22 ianuarie 2000 la o întâlnire extraordinară a Conferinței Părților la Convenția privind diversitatea biologică (Montreal, Canada), a fost adoptat Protocolul de la Cartagena privind Biosecuritatea. Acest document la nivel global reglementează activitățile legate de asigurarea unui nivel adecvat de protecție pentru siguranța transferului, manipulării și utilizării organismelor modificate genetic rezultate din biotehnologiile moderne și care pot avea efecte imprevizibile asupra conservării și utilizării durabile a diversității biologice, ținând de asemenea cont de riscurile pentru sănătatea umană și concentrându-se în special asupra mișcării lor transfrontaliere. Semnarea Protocolului a fost calificată drept un pas semnificativ prin faptul că el asigură

cadrul internațional de reglementare pentru reconcilierea necesităților respective de comerț și protecție a mediului în privința industriei biotehnologice. Astfel, Protocolul creează un mediu favorabil pentru aplicarea ecologică a biotehnologiei moderne, ceea ce permite utilizarea echitabilă a beneficiilor din potențialul oferit de biotehnologie, minimizând în același timp riscurile pentru mediu și sănătatea umană.

Republica Moldova a ratificat Convenția privind diversitatea biologică în a.1995 și Protocolul de la Cartagena privind biosecuritatea în a. 2002. În conformitate cu angajamentele luate, Ministerul Ecologiei și Resurselor Naturale întreprinde mai multe măsuri în vederea implementării prevederilor acestor documente internaționale. În special, au fost elaborate și aprobate Primul Raport Național privind diversitatea biologică, Strategia Națională și Planul de Acțiuni în domeniul diversității biologice, Legea privind securitatea biologică. La momentul actual Republica Moldova întreprinde pași concreți întru fortificarea capacităților în domeniul securității biologice prin dezvoltarea cadrului național de biosecuritate și contribuie la procesul de conștientizare a populației privind problemele în cauză.

Cu scopul implementării prevederilor Protocolului de la Cartagena, Programul Națiunilor Unite pentru Mediu (UNEP) și Fondul Global de Mediu (GEF) acordă asistență tehnică Guvernului Republicii Moldova în vederea consolidării eforturilor întru crearea unui sistem național de securitate biologică.

Proiectul UNEP-GEF „Dezvoltarea Cadrului Național de Biosecuritate în Republica Moldova” (2003-2004) a prezentat parte componentă a Proiectului Global pentru dezvoltarea cadrelor naționale de biosecuritate în mai mult de 100 de țări. Acest Proiect a avut menirea de a contribui la implementarea Protocolului de la Cartagena la nivel național, în special pentru dezvoltarea politicilor naționale, sistemului legislativ, procedurilor administrative al examinării notificărilor, inclusiv evaluării riscurilor, procedurile participării publicului la luarea deciziilor, aplicarea legislației și monitoring al activităților legate de obținerea, transportarea, importul-exportul și comercializarea organismelor modificate genetic și a produselor rezultate din astfel de organisme. În acest scop și prin asistența proiectului a fost elaborat conceptul Cadrului Național pentru Securitatea Biologică (CNSB) al Republicii Moldova, document de recomandare, ce va determina direcțiile prioritare de dezvoltare a sistemului de reglementări și monitorizare a organismelor modificate genetic, în vederea respectării cerințelor Protocolului de la Cartagena.

Cadrul Național pentru Securitate Biologică (CNSB) este o îmbinare de politici, instrumente juridice, administrative și tehnice, care urmează a fi dezvoltate pentru asigurarea unui nivel adecvat de protecție în domeniul securității transferului, manipulării și utilizării organismelor modificate genetic ce rezultă din biotehnologiile moderne și care pot avea efecte adverse asupra conservării și utilizării durabile a diversității biologice, pentru a preveni riscurile asupra sănătății umane.

Guvernul Republicii Moldova a constituit Comisia Națională pentru Securitatea Biologică care este abilitată cu funcția de luare a deciziilor și autorizării activităților legate de utilizarea organismelor modificate genetic. Ca act normativ de aplicare a Legii privind securitatea biologică a fost aprobat Regulamentul privind autorizarea activităților legate de obținerea, testarea, utilizarea și comercializarea organismelor modificate genetic. Legea și Regulamentul stipulează reglementări asupra utilizării în condiții izolate, introducerii deliberate în mediu, introducerii deliberate pe piață, cât și importul/exportul organismelor modificate genetic.

Prin decizia Miniștrilor Ecologiei și Resurselor Naturale și al Educației a fost constituit Centrul pentru Securitate Biologică, care va efectua testări ale GMO și evaluarea adițională, după necesitate, a securității mostrelor, și a riscurilor potențiale ale organismelor modificate genetic asupra mediului și sănătății.

Întru susținerea acestor eforturi, Ambasada Marii Britanii din Chișinău a contribuit la aceste inițiative prin finanțarea co-proiectului „Suport pentru Dezvoltarea Cadrului Național de Biosecuritate în Republica Moldova”. Activitățile planificate în cadrul acestui proiect au fost focusate la trainingul specialiștilor din domeniu, facilitarea procesului de informare și conștientizare a publicului larg și societății civile din Moldova în vederea cunoașterii prevederilor Protocolului de la Cartagena și practicilor țărilor europene întru reglementarea utilizării organismelor modificate genetic.

În prezent în Republica Moldova se implementează Proiectul UNEP-GEF “Suport pentru Implementarea Cadrului Național de Biosecuritate pentru Republica Moldova” (2006-2010). Scopul principal al proiectului este de a asista Republica Moldova în fortificarea capacităților naționale existente, structurile tehnice și infrastructura necesare pentru a respecta obligațiunile țării față de Protocolul de la Cartagena privind Biosecuritatea și de a avea un Cadru Național privind Biosecuritatea pe deplin operațional până în anul 2010.

INTRODUCERE

În conformitate cu definiția Codex Alimentarius Commission (CAC 2001a) (adaptată pentru Protocolul de la Cartagena), biotehnologia modernă este definită ca aplicare in vitro a tehnologiilor cu acid nucleic, inclusiv ADN recombinat și injectarea directă, care depășesc barierele naturale ale fiziologiei reproductive ori barierele recombinării naturale, și acestea nu sunt tehnologii utilizate în reproducerea și în selecția naturală.

Aplicarea biotehnologiilor moderne în industria alimentară oferă noi posibilități pentru dezvoltare și pentru sănătatea omului. Includerea noilor caractere contribuie la majorarea productivității agricole or la îmbunătățirea calității produselor alimentare, care astfel contribuie la ameliorarea sănătății populației. În privința efectelor asupra sănătății publice, pot exista și efecte indirecte, precum reducerea utilizării chimicalelor și creșterea veniturilor gospodăriilor agricole, sporirea viabilității cerealierele și a securității alimentare, în special în țările în curs de dezvoltare.

Ingenieria genetică, în prezent, are ca scop obținerea produselor hipoalergice. Cercetătorii japonezi au creat un soi experimental de orez cu nivel scăzut de alergeni. Matsuda et al. (1996) a aplicat strategia ARN-antisens pentru a reprimă expresia genelor alergice. Deși acest orez este hipoalergic, încă nu a fost acceptat pentru consum de către persoanele alergice.

Caracterele noi ale OMG-urilor pot, de asemenea, aduce și riscuri potențiale. Multe din genele și caracterele utilizate în biotehnologiile agricole sunt noi și nu sunt cunoscute ca alimente inofensive. Există și riscul efectelor negative indirecte asupra sănătății omului prin influența negativă asupra mediului și economiei, inclusiv impactul social și etnic.

Ingenieria genetică și produsele sale au apărut numai în ultimii 20 de ani. De aceea este aproape imposibil de evaluat impactul potențial al speciilor transgenice asupra mediului. Plantele de cultură, rezultate din experiențele de inginerie genetică, reprezintă mai mult decât următoarea generație de varietăți vegetale rezultate din tehnologia modernă – „high-tech”. Ele prezintă două caracteristici specifice care le pot transforma într-un pericol special pentru sănătatea umană sau pentru mediul înconjurător:

În primul rând, plantele MG conțin gene și caractere care sunt complet noi pentru speciile - țintă, mediul lor de viață și fondul lor genetic. În al doilea rând, procesul de inginerizare genetică nu este nici precis, nici direcționat,

ci mai degrabă reprezintă o intervenție brutală. Noua genă introdusă se poate integra oriunde în genomul plantei receptoare.

Efectele nedorite cauzate de OMG-uri organismului uman pot fi datorate:

1. Incluserii propriu-zise a ADN-ului străin în cel uman, fapt ce poate duce la schimbarea activității anumitor gene ale organismului recipient sau la transmiterea pe orizontală a organismelor transgenice spre alt organism.
2. Sinteza proteinelor transgenice noi, care pentru organismul recipient pot fi toxice sau/și alergice.

Principalele preocupări referitoare la siguranța alimentelor care conțin derivate MG se concentrează asupra următoarelor aspecte:

- testele analitice existente și bazele de date, conținând substanțele toxice naturale sau nutriții prezente în alimentele convenționale, nu sunt adecvate pentru a testa modificările neintenționate ale derivatelor MG;
- ingineria genetică poate afecta în mare măsură toxinele, alergenii sau nutriții din alimente;
- alergiile asociate alimentelor pot fi exacerbate prin inginerie genetică;
- folosirea genelor-marker, care conferă rezistență la antibiotice în unele alimente MG, ridică probleme de sănătate.

Două rapoarte, realizate de medici, au evidențiat creșterea îngrijorării printre medicii profesioniști în legătură cu siguranța și reglementarea OMG. Un raport a fost realizat de Asociația de Mediu a Medicilor Irlandezi, fiind publicat în martie 2001 ca răspuns la un raport solicitat de guvern. Acest raport a pus sub semnul întrebării toate cele 3 argumente de bază, pe seama cărora raportul solicitat de guvern își baza concluzia pe faptul că alimentele MG nu reprezintă nici un pericol pentru sănătatea umană. Asociația Medicilor Irlandezi a respins afirmațiile raportului care susțineau: „datele științifice asupra siguranței produselor alimentare MG actuale sunt susținute de lipsa oricărui raport privind efecte adverse rezultate din consumul lor”.

Dr. Cullen de la Asociația Medicilor a spus: „Lipsa totală a etichetării înseamnă că virtual este imposibil să se stabilească o legătură cu alergiile posibile”. De asemenea, dumneaei a adăugat că în ultimul timp s-a constatat o creștere constantă a numărului de alergii la soia printre copiii irlandezi, dar nu a existat nici o posibilitate de a afirma dacă este în legătură cu alimentele ce conțin soia MG, deoarece nu există obligativitatea etichetării acestor produse conform legislației Uniunii Europene.

Raportul grupului de medici irlandezi a reprezentat un ecou al îngrijorărilor exprimate de Asociația Medicilor Britanici (BMA) care în darea de seamă pentru anul 1999 au spus: „Orice concluzie referitoare la siguranța introducerii materialului MG în Anglia este prematură, neexistând actualmente suficiente date pentru a informa factorii de decizie”. BMA a urgentat aplicarea principiului precauției în dezvoltarea plantelor și alimentelor MG, și a afirmat că OMG nu ar trebui să fie eliberate până când nivelul certitudinii științifice va fi suficient pentru a asigura siguranța pentru sănătate și mediu. BMA a cerut un moratoriu pentru plantarea comercială a plantelor MG în Anglia, stabilirea unor sisteme de menținere și urmărire corespunzătoare a segregării și identității plantelor MG și interzicerea utilizării genelor-marker care conferă rezistență la antibiotice în alimentele MG. În plus, ei au subliniat necesitatea cercetărilor ulterioare pentru a determina întregul impact posibil al OMG-urilor asupra mediului și sănătății.

Astfel, savanții susțin următoarele:

- riscurile și beneficiile OMG nu sunt complet clare ori universale;
- capacitatea de a prezice impactul ecologic al speciilor noi (OMG or tradiționale) este joasă, din cauza incertitudinii datelor disponibile;
- pot exista anumite beneficii și riscuri, care nu ar fi încă identificate or prezentate în literatura de specialitate;
- cantitatea și calitatea OMG-urilor, care pot fi elaborate merită atenție specială în privința estimării riscurilor,
- evaluarea minuțioasă a beneficiilor potențiale poate ajuta specialiștii privind determinarea echilibrului între beneficii și riscuri;
- elaborarea măsurilor privind prevenirea transferului de gene către plantele sălbatice poate reduce impactul asupra mediului și contribui la generarea beneficiilor.

1. INTERACȚIUNEA OMG CU MEDIUL AMBIANT

Interacțiunea OMG cu mediul ambiant poate fi variată. Spre exemplu, producerea de substanțe chimice noi or enzime produse de microorganismele modificate genetic (chimicale, adausuri farmaceutice or alimentare etc.) pot contribui considerabil la reducerea cantității de energie utilizată, a toxinelor și deșeurilor solide eliminate în mediul înconjurător. De asemenea, utiliza-

rea cerealelor MG conduce la micșorarea contaminării mediului și expunerea oamenilor la pesticide. Acest fenomen a fost stabilit la utilizarea bumbacului Bt-rezistent (Pray et al. 2002).

Totodată interacțiunea plantelor MG cu cerealele tradiționale or cu cele din familia sălbatică al acestora poate avea efect indirect asupra securității alimentare prin contaminarea resurselor genetice (Quist and Chapela 2001, Ag BioTech 2002; Alvarez-Morales 2002). Atât caracteristicile contaminării cât și a polenizării interspecifice depind de distribuția caracterelor transmise de polenul or semințele a unei plante anumite. De asemenea animalele și peștii MG pot fi o cale indirectă de intrare pe piața alimentară.

Ingineria genetică generează noi forme de poluare sau „contaminare”, denumită generic „poluare genetică” sau „biopoluare”. În anumite cazuri, biopoluarea poate avea efecte majore asupra sănătății și mediului înconjurător, astfel creând riscuri biologice (polenizarea încrucișată).

Introducerea de noi specii în ecosisteme a dus la fenomenul numit „bioinvazie”. Există multiple căi prin care OMG sporesc vulnerabilitatea ecologică a agriculturii. Unii savanți indică patru motive din cauza cărora biotehnologia poate duce la creșterea utilizării substanțelor chimice în agricultură:

1. Produsele ingineriei genetice pot cauza rezistența la erbicide. Aceasta poate duce la creșterea, nu la scăderea utilizării erbicidelor.
2. Substanțele chimice se vor răspândi și în regiunile unde nu se practică utilizarea acestora.
3. Creșterea rezistenței dăunătorilor la culturile BT și distrugerea alternativelor ecologice pentru combaterea dăunătorilor.
4. Introducerea în plante a unei toxine poate duce la efecte adverse, inclusiv poate spori eliminarea toxinelor de către aceste plante și prin urmare în întregul ecosistem.

Astfel, unele din consecințele posibile sunt:

Crearea de noi dăunători: o plantă de cultură, care a fost modificată prin inginerie genetică pentru a fi tolerantă față de săruri ar putea scăpa (evada) din lanul de cultură, ar putea invada estuarele, sufocând vegetația naturală a acestui habitat.

Amplificarea problemelor cu dăunătorii deja existenți: plantele de cultură sunt capabile de a transfera gene la distanțe de kilometri la specii înrudite, prin polenizarea mediată de vânt sau insecte, unele dintre aceste specii putând fi buruieni cunoscute. Astfel, genele străine de la plantele de cultură cu

caractere inginerizate, cum ar fi toleranța la erbicide sau uscăciune, ar putea fi transferate la buruieni, făcându-le și mai greu de controlat.

Afectarea speciilor nevizate, non-țintă: virusurile, microorganismele sau plantele modificate genetic pentru a omorî insectele dăunătoare ar putea afecta și insectele utile. În experimentele de laborator, bacteriile modificate pentru a converti reziduurile vegetale cum ar fi frunzele în alcool, cu scopul utilizării acestuia ca și combustibil, au determinat reducerea populațiilor de ciuperci (fungi) benefice. În unele cazuri, au fost distruse și ierburile din zone învecinate prin otrăvire cu alcool.

Reducerea biodiversității prin înlocuirea speciilor native: plantele de cultură GE care au un avantaj de supraviețuire ar putea evada din câmpurile de cultură, ar putea invade alte ecosisteme și ar putea înlocui alte specii. Această pierdere a biodiversității ar putea diminua sever abilitatea ecosistemelor sau speciilor de a răspunde cu succes la stresuri neașteptate, cum ar fi uscăciunea sau bolile.

Irosirea unor resurse biologice valoroase: bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) este utilizată în mod curent ca și pesticid natural. Cercetătorii însă au modificat genetic numeroase plante de cultură cu Bt și acest fapt ar putea grăbi viteza cu care diferite insecte se adaptează și devin rezistente la Bt, făcând tehnologia inefectivă.

Dacă OMG-urile supraviețuiesc și prosperă ele ar putea înlocui speciile sălbatice naturale și acele plante și animale care depind de acestea. Tendința de a crea plante de cultură „super”, gândite să fie capabile să se autoprotejeze de dușmanii lor principali, cum ar fi insectele și bolile, ar putea duce la proliferarea lor în detrimentul plantelor native. Biodiversitatea ecosistemelor situate în apropierea lanurilor cultivate cu plante de cultură „super” ar putea fi în pericol. În timp, plantele modificate genetic ar putea înlocui total flora nativă și ar putea pune în pericol supraviețuirea vietăților sălbatice care depind de această floră. Un exemplu bine documentat pentru efectele negative ale fluxului de gene de la varietățile agricole la rudele sălbatice este extincția orezului sălbatic în Taiwan. Orezul sălbatic hibridizează cu orezul cultivat. Deja în anii 1950, caracteristici ale orezului cultivat au putut fi detectate în populațiile de orez sălbatic. Conform opiniei cercetătorilor taiwanezi, extincția orezului sălbatic în Taiwan a fost determinată de fluxul de gene de la varietățile Japonica, introduse în 1930.

2. CONSECINȚELE UTILIZĂRII BIO-TEHNOLOGIILOR AGRICOLE

Biotehnologiile intervin pentru transformarea produselor brute în alimente, furnizând enzime pentru fabricarea pâinii, lactatelor, braserie. Alte enzime intervin în fabricarea sucurilor, aromelor etc. Biotehnologiile fac industria agroalimentară mai puțin poluantă. De exemplu, la transformarea amidonului în zahăr, enzimele permit diminuarea consumului vaporilor de apă cu 30%, iar a deșeurilor - cu 50%. Ele suprimă 90% din produsele adiționale nedorite.

2.1. Agricultură ecologică

Rezistența față de insecte este unul dintre caracterele-cheie modificate în plantele agricole prin inginerie genetică. Prin inginerie genetică, se introduc în plantele de cultură toxine, care omoară insectele care se hrănesc cu plante. Cele mai des utilizate toxine sunt așa-numitele „toxine Bt”, provenind de la bacteriile din sol *Bacillus thuringiensis*. Se cunosc mai multe toxine Bt cu diferite proprietăți toxice. S-a crezut că aceste toxine sunt selective, că ele nu omoară orice insecte ci numai anumite insecte. Există toxine Bt care se spune că sunt specifice pentru muște, altele pentru larvele de fluturi sau gândaci. De zeci de ani suspensiile bacteriene au fost folosite în agricultură – în deosebi în agricultura ecologică – pentru a lupta împotriva insectelor dăunătoare. Preparatele naturale de toxină Bt sunt compuse din cristale proteice aflate în spori bacterieni, care se dispersează simplu pe suprafața plantelor și care apoi sunt rapid inactivate de razele solare și de alți factori de mediu.

O serie de studii științifice au dezaprobat prezumția că toxinele Bt din plantele MG ar avea aceleași caracteristici favorabile ca și toxinele Bt în stare naturală. Este acum cunoscut printre oamenii de știință că toxinele Bt din plantele transgenice – spre deosebire de toxinele Bt în formă naturală în bacterii – pot afecta speciile din lanțul trofic și se pot acumula în mediu. Toxina naturală Bt, prin interacțiunea sa cu bacteria, apare în stare cristalină, inactivă. Dar, în plantele transgenice Bt, cum ar fi porumbul produs de firma Pioneer, toxina va apărea ca o proteină vegetală preactivată, care se sintetizează pe parcursul întregii vieți a plantei. Astfel, plantele de cultură MG rezistente la insecte se pot dovedi nefaste pentru multe specii non-țintă și pot afecta echili-

brul ecologic. De asemenea, insectele expuse tot timpul acțiunii toxinei sunt pre-sate continuu pentru a-și dezvolta rezistență. Datele științifice sugerează că prin folosirea necontrolată a plantelor transgenice Bt insectele vor dezvolta rezistență la această toxină. Aceasta este îngrijorarea cea mai serioasă pentru agricultura ecologică, deoarece poate pune în pericol viitorul utilizării toxinei Bt naturale de către sistemul durabil al agriculturii ecologice.

Bacteria *Bacillus thuringiensis*, sub formă de suspensie, au fost spray-ate (dispersate) pe suprafața plantelor de cultură de mai mult de 50 de ani, reprezentând o metodă biologică de combatere a insectelor. Există sute de tulpini de Bt care produc aproximativ 200 cry-proteine. Bt afectează anumite specii de insecte, în mod specific, cum ar fi larvele, iar spary-urile reprezintă o metodă foarte utilă de combatere pentru agricultura ecologică, mai ales atunci când există o infestare serioasă. Diferite tulpini de Bt sunt specifice diferitor receptori din peretele intestinal al insectei, din această cauză toxicitatea Bt depinde de afinitatea sa față de receptori. S-a dovedit că omul și celelalte vertebrate nu au astfel de receptori, din aceasta cauză toxinele sunt inofensive.

Scurt istoric

Biologul japonez Shigetane Ishiwatari, studiind cauza bolii care nimicea în masă viermii de mătase, a izolat pentru prima dată bacteria Bacillus thuringiensis în 1901. În 1911, independent, E. Berliner a izolat bacteria care nimicea molia făinii, și astfel a redescoperit această bacterie, numind-o Bacillus thuringiensis, după denumirea orașului Thuringia, Germania, unde a fost descoperită. În 1915, Berliner raportează despre existența cristalelor Bt, dar activitatea acestora va fi descoperită mai târziu. Astfel, în 1920, a început utilizarea Bt în calitate de pesticid, comercializat sub formă de spray. Această formă, însă, era neconvenabilă din cauză că era ușor înlăturată cu ploaia și degrada sub acțiunea razelor UV. Un alt inconvenient era că nu nimicea insectele care parazitan la rădăcina și pe partea dorsala a frunzelor. Până în 1977 au fost descrise doar 13 tulpini de Bt, toate fiind toxice doar față de anumite specii de larve de lepidoptere. În 1980, a crescut frecvența utilizării Bt din cauza creșterii rezistenței insectelor la insecticidele sintetice și impactului negativ al acestora asupra mediului.

În SUA, toate populațiile naturale de gândac de Colorado (CPB) sunt încă sensibile la toxina Bt. Totuși în experimente de laborator a fost identificat un gândac de Colorado rezistent la toxina Bt.³² Acest ecotip de CPB a putut supraviețui pe plante transgenice Bt timp de două generații.³³ Mai mult, dezvoltarea rezistenței insectelor la o toxină Bt duce la rezistență și față de alte toxine Bt. De exemplu, insectele selectate ca fiind rezistente la toxina Bt CryIA (c) au prezentat rezistență și la toxinele CryIA(a), CryIA(b), CryIB, CryIC și CryIIA.

2.2. Biopesticide

O nouă posibilitate de a lupta cu insectele dăunătoare este folosirea virusului Baculovirus, care le afectează în mod natural. Acesta infectează doar insectele și are un potențial biopesticid din cauză că acționează doar asupra nevertebratelor (artropodelor), posedă specificitate și cauzează moartea anumitor insecte-țintă (Carstens, 1996). Baculovirusul acționează încet, având nevoie de 5-14 zile pentru a distruge insecta și are o virulență moderată. Perioada lungă de activare sugerează că insectele pot aduce daune considerabile plantelor în acest răstimp. În plus, producerea baculovirusului este mai costisitoare decât producerea pesticidelor chimice. Dar întrucât tendința de bază în prezent este de a le abandona și întrucât crește și rezistența vătămaților la ele, producerea agenților benigni (biopesticidele) devine un obiectiv de bază.

Astfel, în prezent, cercetătorii au demonstrat metode ale ingineriei genetice cu ajutorul cărora au accelerat activitatea virusului. Prin incorporarea hormonilor, care afectează viabilitatea insectei se obține scăderea apetitului sau accelerarea metamorfozei și insecta moare mai repede. De exemplu, baculovirusul MG, care conține hormonul Hez-HK-II (Suszkiw, 1998) provoacă dereglări grave în metabolismul larvei. Aceasta încetează să mănânce și în 2 zile moare. Baculovirusul este distrus momentan de razele solare.

3. CONSECINȚELE APLICĂRII INGINERIEI GENETICE ÎN INDUSTRIE

Metodele biotehnologice sunt aplicate atât în agricultură cât și în industrie. Cu timpul, materialele plastice ar putea fi înlocuite de către biopolimeri. Spre exemplu, producerea materialelor plastice, a uleiurilor, a diferitor tipuri de ceară etc. Astfel multe produse obținute în baza de petrol pot fi înlocuite de către produsele obținute din plante MG.

În 1992, savanții au izolat gena necesară pentru producerea plasticului, au transferat-o în planta *Arabidopsis*, obținând astfel prima plantă care sintetizează polihidroxicanoatul (PHA-derivat de plastic din plante). Tehnologia dată a fost ulterior implementată și adaptată pentru porumb, astfel încât PHA să fie produsă doar în tulpini și în frunze lăsând spicul liber, pentru a fi folosit în hrana omului și a animalelor. Dar purificarea și prelucrarea ulterioară a substanței

obținute pentru definitivare cheltuieli suplimentare, astfel, în comparație cu industria petrolieră depășește costurile de 300 de ori. Prin urmare, Monsanto (primii producător de PHA) au abandonat această afacere.

Totuși este explorată producerea altor potențiali polimeri în bază de plante – fibrele naturale. Anumite bacterii sunt modificate genetic pentru a sintetiza polimeri naturali, cum ar fi mătasea naturală, elastina, colagenul și cheratina (Somerville, Bonetta, 2001).

Merită de a fi menționate posibilitățile ingineriei genetice de a modifica compoziția acizilor grași și compoziția uleioasă a plantelor. Acizii grași pot fi folosiți atât în alimentație cât și în calitate de precursori pentru sinteza materialelor, ca de exemplu a nailonului (Somerville, Bonetta, 2001).

3. 1. Industria Chimică

Obiectivul de bază a biotehnologiilor este de a privilegia întrebuințarea materiei prime biologice, precum și de a diminua producerea deșeurilor și a gazelor cu efect de seră. De asemenea, bio-tehnologiile vor diminua necesitățile în apă, în particular cele utilizate la răcirea instalațiilor industriale.

Creând o chimie „ușoară” datorită enzimelor, biotehnologiile permit diminuarea utilizării apei și a petrolului, respectiv-diminuarea producerii gazelor cu efect de seră. Astfel, în 2010-2020, biotehnologiile trebuie să permită producerea lubrifianților, solvenților, carburanților în baza produselor agricole (rapița, porumbul etc.) la preturi rezonabile. Enzimele mai sunt folosite în fabricarea detergenților, textilelor, hârtiei, alimentelor.

Soluțiile și prafurile de spălat: Detergenții sunt substanțele care facilitează emulsionarea murdăriei. Enzimele amplifică efectul detergenților descompunând petele din interiorul țesăturii. În substanțele pentru spălat se conțin, de asemenea, și fosfați pentru dedurizarea apei. Ei previn formarea calcarului, evitându-se astfel blocajul acțiunii detergentului. Dar fosfații au o acțiune nefastă asupra mediului, iar enzimele permit spălarea fără adaosul fosfaților. Enzimele sunt produse de microorganisme. Eficacitatea acestora este constant ameliorată, astfel încât ele sunt active la temperaturi joase și rezistă la acțiunea altor componente. Cu toate acestea există detergenți de origine vegetală (săpun în bază de ulei de măsline etc.), două treimi sunt de geneză petrolieră, utilizat încă din 1980.

Este posibil ca în 2010-2020 să apără pe piața detergenții de origine vegetală pe bază de rapiță, o planta bine adaptată la producția industrială. Deja au fost introduse în unele culturi de rapiță genele necesare.

Hârtie: Pasta pentru fabricarea hârtiei este compusă din celuloza de lemn, obținută după eliminarea particulelor dure (lignina). Prelucrarea chimică clasică necesită agenți corozivi (clorul, soda s.a.) și consum sporit de energie (măcinarea, uscarea termică sub presiune). În plus, pasta pentru hârtie poluează o cantitate mare de apă și generează mirosuri neplăcute. Folosirea enzimelor permite micșorarea cantității de apă fără a suprima definitiv prelucrarea chimică.

O ameliorare tehnologică poate fi obținută creând specii de arbori destinați anume producerii hârtiei, care datorită ingineriei genetice au fost deja obținute. Se presupune, că către anii 2015-2020, se vor face concluzii în privința rentabilității acestor specii.

Depoluarea: În natură există microorganisme cu capacitate de descompunere a petrolului, produselor toxice și de concentrare a metalelor. Acestea sunt actualmente utilizate pentru depoluarea rețelelor industriale, resorbția deșeurilor organice. Procesul respectiv poate fi ameliorat odată cu introducerea enzimelor mai eficiente și a asociației optime de microorganisme, de asemenea, o dată cu crearea microorganismelor speciale pentru anumite grupuri de poluanți. Între 1994 și 1999 cifra bio-tehnologiilor utilizate a crescut de la 7% la 8% în Europa.

Biocarburanții: Biocarburanții sunt subproduse ale agriculturii care pot înlocui benzina, gazul etc. Ei se obțin din produse bogate în zahăr ori în amidon (trestia de zahăr în Brazilia, porumbul în SUA, sfecla de zahăr în Europa), sau din uleiul de rapiță.

Biocarburanții pot fi folosiți în cantități mari în forma sa pură, pentru motoarele cu ardere internă, în urma unor adaptări a motoarelor. De asemenea, ei pot fi amestecați în cantități mici cu carburanții obișnuiți, fiind utilizați fără a regla motoarele.

În 2000, prețurile la bio-carburanți erau de 4 ori mai mari decât la produsele petroliere. În toate țările această diferență este compensată de facilitățile fiscale. Obiectivul acestora este de a oferi posibilități de dezvoltare sectorului biocarburanți și de a nu mări consumul de petrol în viitor.

4. IMPACTUL OMG ASUPRA SĂNĂTĂȚII PUBLICE

Privitor evaluarea siguranței plantelor MG, se consideră că alimentele sunt complet digerate și genele din produsele alimentare consumate nu pot circula către celulele recipientului. Totuși această presupunere nu a fost verificată până în momentul actual, când unele studii au arătat că fragmente de gene pot circula și uneori se pot integra în cromozomi organismului-„gazdă”.

Apoi a fost demonstrat că ADN-ul nu este dezintegrat totalmente în tractul gastrointestinal. Segmentele de ADN ingerate pot avea dimensiunile necesare pentru a conține gene întregi care rămân intacte și pot înainta către țesuturi și pot nimeri în sânge. ADN-urile conțin elemente genetice numite „CpG motif”, care pot provoca sistemul imun la o reacție de tip inflamator.

Odată eliberate în mediu, plantele MG nu mai pot fi îngrădite. Ca toate organismele vii, plantele MG se reproduc și aceasta este o posibilitate pentru gene să scape în afara zonei de creștere destinată inițial. Calea majoră de a scăpa în mediul natural, sălbatic, a noilor gene introduse, este prin transferul polenului. Semințele pot fi culese de păsări și lăsate să cadă în altă parte, mamiferele mai mari pot transporta tuberculii de cartof, sau organe de reproducere pot fi chiar dislocate de vânt.

Majoritatea plantelor de cultură MG aflate pe piață actualmente conțin gene marker care conferă rezistență la antibiotice, alături de caracterele dorite cum ar fi rezistența față de insecte sau erbicide. Există riscul ca aceste gene să fie transferate de la plante la microorganisme producătoare de boli dacă plantele transgenice sunt utilizate ca furaj pentru animale sau ca alimente pentru oameni. Aceste bacterii vor deveni prin urmare imune la tratamentul cu antibiotice.

Cercetările asupra existenței transferului de gene și a dimensiunii acestuia au început numai recent, de aceea datele științifice existente sunt incomplete. În anul 2002, cercetătorii englezi au demonstrat pentru prima oară că materialul modificat genetic (ADN) din alimente își găsește calea spre bacteriile din intestinul uman, ridicând probleme potențiale serioase de sănătate. Multe plante MG au inserate gene marker de rezistență la antibiotice deja într-un stadiu timpuriu de dezvoltare. Dacă materialul genetic al acestor gene marker găsește o cale de a ajunge în stomac, ceea ce cercetătorii de la Universitatea Newcastle (Anglia) au sugerat că este posibil, atunci eficacitatea antibioticelor folosite pe scară largă ar putea fi compromisă.

Într-un studiu publicat în revista *La Recherche*, profesorul Patrice Courvalin de la Institutul Pasteur din Franța a accentuat posibilitatea ca rezistența

la antibiotice să fie transferată de la plantele transgenice în mediu și deci să ajungă în tractul digestiv. Lucrearea atenționează asupra faptului că prin cultivarea pe scară largă a plantelor transgenice se accentuează problema deja dificilă a bacteriilor rezistente. Există suficiente date științifice care susțin că:

- genele pot fi relativ stabile în intestin;
- bacteriile pot în principiu prelua gene în intestinul mamiferelor;
- transferul orizontal de gene de la microorganismele modificate genetic la bacterii a fost observat în intestinul insectelor (și anume la colebole);
- bacteriile din sol pot prelua gene din sol.

Deoarece aceste gene sunt inutile și periculoase pentru sănătatea umană, multe autorități de reglementare din Europa se opun folosirii genelor-marker care conferă rezistență la antibiotice.

4.1. OMG - declanșatorii alergiilor

După Profet (1991), reacțiile alergice sunt răspunsuri de adaptare și de apărare a organismului la proteina toxică. La persoanele sensibile reacția alergică poate fi provocată chiar și de o doză infimă de alergen. Este foarte greu de stabilit individual doza minimă declanșatoare. Totuși consecințele reacției alergice depind de cantitatea ingerată de alergen, astfel gravitatea depinde de doză¹.

Alergiile alimentare sunt foarte frecvente în toate țările dezvoltate și afectează în medie 3-4% din populația adultă și până la 8% copii. Alergiile alimentare sunt bazate pe reacții imunologice, spre deosebire de intoleranța alimentară, definită ca reacție non-imunologică (Bargmann et al. 1992, Klein 1991).

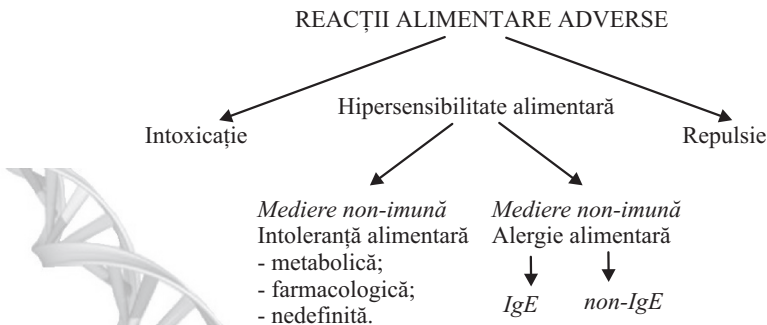


Figura 1. *Prezentare schematică a reacțiilor alimentare adverse*

¹Majoritatea alergenilor sunt glicoproteine hidrosolubile cu masa moleculară între 18 și 70 kDa (Lemke and Taylor 1994). Masa moleculară de 10 kDa reprezintă limita de jos pentru răspunsurile alergice.

Alergiile pot fi divizate în 4 categorii. Alergiile alimentare pot fi de tip I, III, IV (Lemke and Taylor 1994 S.117ff), dar cel mai des de tip I (Aulepp and Vieths 1992). Reacțiile alergice de tipul I sunt acute sau de tip imediat. După ingestie sau inhalare, alergenii alimentari induc producerea anticorpilor specifici (IgE), cu care apoi interacționează (Lemke and Taylor 1994). Sunt cunoscute circa 10 tipuri de produse alimentare, care cauzează 90% din alergiile alimentare severe întâlnite în emisfera de vest (Vieths et al. 1996, Schafer 1996) (Tab.1).

Tab.1. *Produse alimentare cu potențial alergic*

Alimente alergice (cauzează > 60 % alergii alimentare la copii)	Alimente alergice (cauzează > 90 % alergii; adițional celor 60 %)
arahide soia grâu lapte de vaci ouă	pește de mare crustacee (creveți, raci, crabi) fructe legume (țelină, morcovi)

Bargman et al. (1992), Lemke și Taylor (1994), Schafer (1996) și Vieths et al. (1996)

Reacțiile alergice la alimente sunt bine cunoscute. Majoritatea alergenilor alimentari sunt de structură proteică și se conțin în ouă, pește, fructe de mare (inclusiv crustacee), soia, nucușoare (migdale, arahide, alune de Brazilia, alune de pădure, acaju (*Anacardium*), fistic și nuci), grâu. Datorită faptului că acești alergeni sunt cunoscuți, a fost posibil de a elabora și utiliza metode de testare, actualmente mult mai avansate. Totuși alimentele tradiționale nu sunt, de regulă, verificate pentru conținutul de alergeni înainte de a fi livrate pe piață (Tab 2).

Întrucât orice aliment ce conține proteine poate fi un potențial alergen, introducerea unei noi proteine sau orice schimbare în structura celor deja existente sau modificarea cantitativă poate afecta, de asemenea, capacitatea alergizantă a produselor derivate.

Metodele biotehnologice disponibile în prezent pot fi utilizate în mai multe scopuri:

1. Inhibarea activității genei (reducerea producerii proteinelor).
2. Activarea genei existente (inițierea producerii proteinei).
3. Replicarea genei existente (creșterea producerii proteinelor specifice).

4. Schimbarea genelor existente (schimbarea compoziției sau eliminarea proteinei).
5. Introducerea genelor noi de la alte specii.

Introducerea biotehnologiilor moderne în agricultură ar putea influența siguranța alimentelor în cazul în care noile proteine alimentare ar putea fi cauza reacțiilor alergice, iar teste veridice pentru determinarea capacităților de alergizare a proteinelor noi, lipsesc. Astfel, concluziile privind proprietățile alergizante ale proteinelor pot fi făcute doar în baza factorilor de risc.

Experții FAO/WHO (FAO/WHO 2001a) au stabilit un proto-

col de evaluare al potențialului alergizant al alimentelor MG. Protocolul este aplicabil pentru alimentele care conțin gene derivate atât din surse cunoscute, ca fiind alergice, cât și din surse care nu au prezentat pericol alergic.

Grupul de experți oricum, și-a exprimat dezacordul privind transferul genelor din alimentele-alergeni, excepție făcând doar cazurile în care a fost demonstrată lipsa capacităților alergizante al proteinelor rezultate în urma transferului de gene.

Aceste principii au fost aplicate de numeroase agenții pentru evaluarea siguranței alimentelor MG și au servit ca bază pentru *Ghidul privind estimarea securității alimentelor produse prin biotehnologii (Codex Alimentarius Commission. Guidelines for the safety assessment of foods derived from biotechnology [CAC 2003c,d])*.

Pe parcursul ultimilor ani, savanții și comunitățile medicale devin tot mai neliniștiți în privința creșterii incidenței alergiilor provocate de plantele MG. Datorită faptului că alimentele MG conțin proteine de la alte organisme ale căror gene le-au fost transferate, reacțiile alergice cauzate de acestea sunt considerate ca principalul pericol pentru sănătatea omului.

În primul rând, modificările genetice pot crea în plante schimbări, care rezultă în expresia unui nou alergen sau în creșterea expresiei alergenilor en-

Protocol de evaluare a riscului pentru alergiile alimentare:

1. Evaluarea capacității de alergizare (dacă alimentele or anumite ingrediente au un potențial alergic).
2. Evaluarea cantitativă a alergenului (dacă concentrația de alergen este inofensivă).
3. Evaluarea expozițională (care e calea posibilă de a contacta alergenul).
4. Evidențierea subpopulației sensibile (care ar fi răspunsul alergic la alimentele noi).

dogeni. Drept exemplu poate servi alergenul din alunele de Brazilia în soia MG.

Soia este o importantă sursă de proteine în dieta omului și a animalelor, dar este săracă în metionină. Pentru a îmbunătăți calitățile ei nutriționale, cercetătorii de la Pioneer Hi-Bred International au creat soia mG, care produce o proteină bogată în metionină, a cărei genă a fost preluată de la alunele de Brazilia (alunele de Brazilia conțin 18% metionină). Datorită faptului, că alunele de Brazilia sunt cunoscute ca alergeni, s-au făcut investigații în privința proprietăților alergizante a soiului MG. Drept rezultat, s-a determinat că persoanele alergice la alunele de Brazilia, dezvoltă reacții alergice și la soia MG, din care cauza a fost sistată producerea acesteia.

În 2004, a apărut informația despre îmbolnăvirea fermierilor din Filipine. Aceștia locuiau în apropierea câmpurilor semănate cu soiul transgenic de Porumb² (Dekalb 818 YG). Manifestarea simptomelor coincidea cu perioada de înflorire și de răspândire a polenului. Porumbul a fost modificat genetic pentru a produce insecticidul Bt-toxina Cry1Ab toxică pentru viermele sfredelitor al porumbului.

Simptomele prezentate se refereau la sistemul respirator (strănut, tuse alergică, până la astm ș.a.), tractul digestiv și tegumente, de asemenea era prezentă febra. Simptomele respective dispăreau odată cu plecarea în alte raioane ale țării și reapăreau la întoarcere. Pentru început, s-a presupus că este vorba de o boală infecțioasă, dar în urma diferitor cercetări, această presupunere a fost infirmată.

Alte exemple de modificare genetică sunt introducerea Bt-toxinei Cry1Ac în bumbac, orez, tomate ș.a. culturi pentru a le proteja împotriva unor lepidoptere. Au fost efectuate 3 studii pe șoareci în privința Bt-toxinei Cry1Ac. Două din aceste studii ne arată că Bt-toxina inițiază un răspuns mediat de anticorpi în sânge și în mucoasele organelor șoarecilor. Al treilea studiu demonstrează că Cry1Ac crește răspunsul imun la alți antigeni.

Într-un studiu publicat în *Natural Toxins* se menționează că șoarecii care au avut o dietă bazată pe culturile MG, în care se conținea Cry1Ac, au prezentat la examenul histologic al ileonului (porțiunea inferioară a intestinului subțire) tulburări structurale și de creștere.

² BT – *Bacillus thuringiensis* produce proteine insecticide, sub formă de cristale parasporale (Cry protoxine), în faza de sporulare.

Toate aceste studii ne demonstrează că protoxina Cry1Ac este un imunogen activ la mamifere, răspunsul imun manifestându-se atât sistemic, cât și, la nivelul mucoaselor și de aceea poate fi o amenințare pentru organismul uman.

Un alt soi de Bt porumb – Strlink a fost produs de societatea Aventis Crop Science, autorizat în SUA (1998), pentru alimentația animalelor și industria etanolului. În septembrie 2000, GEFA (Genetically Engineered Food Alert) a descoperit prezența acestuia în diferite produse alimentare, iar 44 de americani au depus plângere în privința acestuia, prezentând simptome precum diareea, voma și reacții alergice cutanate.

În urma testelor efectuate, cauza s-a dovedit a fi producerea Cry 9C proteina³ – una dintre familia proteinelor cristalice (Cry), care îi conferă porumbului un caracter insecticid. Spre deosebire de alte Cry proteine, Cry 9C este termostabilă și rezistentă la acțiunea sucului gastric – aceștia fiind principalii indicatori ai potențialului alergic.

Un alt moment important este că la această varietate de porumb expresia genei ce codifică Cry 9C se petrece nu numai în polen și frunze, ci și în semințele acestuia, ceea ce îi sporește pericolul pentru sănătate. Astfel, concentrația Cry 9C în semințe este de 10-400 ori mai mare decât producerea de Cry proteine la alte varietăți de porumb. (Dr. A. Felsot. Insecticidal genes: part 2. Agrichemical and environmental news. no.168, April 2000, table 2, p.4).

Mai mult de jumătate din proteinele transgenice, care asigură rezistența plantelor la insecte și la bolile cauzate de ciuperci, și bacterii, sunt toxice și alergice. Există câteva grupuri de proteine, cunoscute ca alergeni, care participă la mecanismele naturale de apărare a plantelor. Unele din acestea (1) inhibitorii alfa-amilazei și tripsinei, (2) lectinele, (3) proteine legate de patogeneză sunt utilizate în ingineria genetică pentru a crește rezistența culturilor agricole.

³ Sunt cunoscute mai mult de 60 de astfel de proteine. Trei proteine sunt folosite în ingineria Bt porumbului și sunt exprimate de genele Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9c.

Căile de apariție a proprietăților alergice la plantele MG:

1. inserția unei gene ce sintetizează o proteina deja cunoscută ca alergen;
2. transgeneza, care adițional caracterului dorit induce sinteza proteinelor alergice;
3. perturbare întâmplătoare la nivelul genomului cu modificarea proteinei rezultate, care posedă proprietăți alergice.

Tabelul 2. Alergeni alimentari cu funcții cunoscute în reacțiile de apărare ale plantelor.

Planta	Alergenul	Funcția de apărare a plantei
Arahide (<i>Arachis hypogaea</i>)	Lectina	Retardare în dezvoltarea <i>Callosobruchus maculatus</i>
Soia (<i>Glycine max</i>)	Inhibitorul tripsinei	Retardarea creșterii larvei <i>Spodoptera litura</i>
Grâu (<i>Triticum spp.</i>)	Aglutinina germeților de grâu WGA Izolectine: <i>T.aestivum</i> : WGA A <i>T.aestivum</i> : WGA D <i>T.durum</i> : WGA B	Activitate insecticidă pentru <i>Callosobruchus maculatus</i> Activitate insecticidă pentru <i>Ostrinia nubilalis</i> ; Inhibarea creșterii larvei <i>Diabrotica undecimpunctata</i>
Orz (<i>Hordeum vulgare</i>)	Alfa-amilaza / inhibitorul tripsinei	Inhibarea alfa - amilazei la <i>Tenebrio molitor</i>

Consequences of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicology and allergenicity. S. L. Franck-Oberspach and B. Keller. *Plant breeding* 116, 1-17 (1997).

Așadar, este posibil ca o proteină non-alergică într-un organism să devină alergen în altul. Dacă o proteina bacteriana este trecută în plantă, aceasta poate să-i cauzeze modificări posttranslaționale, inducând proprietăți alergice. Chiar și cea mai frecventă modificare – glicozilarea (înzestrarea proteinei cu lanțuri polizaharidice) o modifică substanțial.

INHIBITORII ALFA-AMILAZEI

Un șir de patologii alergice sunt cauzate de inhibitorii α -amilazei. Spre exemplu, astmul Baker este o reacție alergică de tip I, care cel mai des se declanșează la inhalarea făinii de cereale (Garcia-Casado et al., 1995). ADN-ul responsabil pentru producerea inhibitorului α -amilazei la insecte se găsește în endospermul semințelor de grâu – *Triticum aestivum* (Gomez et al., 1990). Alergeni de tip similar, care provoacă reacții mediate de IgE, au fost depistați în orez (*Oryza sativa*) și orz (*Hordeum vulgare*). Secvența ADN-ului pentru inhibitorii alergici ai α -amilazei din grâu denotă similitudine cu ADN-ul inhibitorilor din orez și orz, respectiv 40% și 20%.

Proteina alergică din orez este termostabilă și rezistentă la agenți proteolitici, fapt ce cauzează probleme mari pacienților alergici. Încercările de a crea orez hipo-alergic au dat deja anumite rezultate, dar rezultatele obținute încă nu conferă certitudine deplină privind toleranța acestui orez de către pacienți.

Studiile realizate cu semințele de muștar galben (*Sinapis alba*) au constatat o asemănare a alergenilor proprii acestei plante cu inhibitorii α -amilazei din cereale (Menendez-Arias et al., 1988), fasole, mazăre etc.

Astfel, rezultatele studiilor efectuate sugerează că proteinele din familia inhibitorilor α -amilazei sunt alergeni potențial, cel puțin în cereale și legume (Izumi et al., 1992).

INHIBITORII TRIPSINEI

Un alt exemplu ține de inhibitorul tripsinei din *Vigna unguiculata*, care protejează o planta model de tutun împotriva *Heliothis virescens* (Hilder et al., 1987).

Inhibitorii tripsinei cauzează dereglări serioase în organismul insectelor, cele mai afectate fiind lepidopterele (mai ales larvelor acestora). Ele constau în dereglări de digestie urmate de scădere ponderală până la moartea acestora. Astfel, aceste proteine devin un bun remediu insecticid pe larg folosit în ingineria genetică. Ca exemplu de aplicare poate servi preluarea genei ce codifica inhibitorul tripsinei de la muștarul alb (Menegatti et al., 1992) și transferarea acesteia la tutunul MG.

Însă pentru a se ajunge la efectul insecticid scontat, nivelul de expresie a acestei proteine în plantele MG trebuie să fie nu mai mic de 1% din cantitatea totală a proteinelor solubile (Hilder et al., 1987; Leple et al., 1995), ceea ce poate cauza la om efecte nedorite majore.

În afara de efectele alergice pe care le cauzează, inhibitorii tripsinei pot produce serioase dereglări digestive, pot reduce digestia proteică și pot cauza deficiență de absorbție a aminoacizilor. În testele efectuate pe animalele dietei cărora era bogată în inhibitori ai tripsinei s-a observat favorizarea proceselor patologice a pancreasului, inclusiv cancerul.

Luând în considerare faptul că unele proteine din cerealele și legumele din familia alfa-amilazei și a inhibitorilor tripsinei sunt alergice, orice cultură alimentară transgenică ce conține astfel de inhibitori necesită o testare minuțioasă pentru a asigura inofensivitatea lor pentru persoanele alergice.

LECTINELE

Prin termenul „lectină” (aglutinina) este definită o clasă de proteine sau glicoproteine, cu proprietăți aglutinante față de alte celule, care pot lega reversibil hidrați de carbon, fără a le modifica structura. (Peumans și van Damme,

Efectele interacțiunii lectină - intestin:

1. Alipirea către celulele mucoasei intestinale; destrucția membranei microvillus; celulelor „shedding” – reducerea capacității de absorbție a intestinului subțire.
2. Creșterea endocitozei; inducția proceselor hiperplastice ale intestinului subțire; creșterea turnover a celulelor epiteliale.
3. Interferarea cu sistemul imun; reacții de hipersensibilitate.
4. Interferarea cu flora intestinală; înmulțirea selectivă exagerată.
5. Efecte directe și indirecte asupra metabolismului.

1995). Atașându-se de membrana celulară în diverse organe (cel mai des intestin), acestea provoacă aglutinarea sau pot iniția o cascadă de răspunsuri imune sau autoimune, care până la urmă pot provoca moartea celulei. Diferite lectine vizează organe și sisteme diferite ale organismului.

Odată ce lectina intactă se localizează la un anumit nivel din organism, ea are realmente un efect „magnetic” asupra celulelor din regiunea respectivă. Ea aglomerează celulele și acestea sunt țintite spre a fi distruse, fiindcă sunt considerate de propriul organism drept elemente străine invadatoare. Această aglomerare poate cauza sindromul de iritație la nivel intestinal sau

ciroză hepatică, dar poate să cauzeze și blocarea fluxului sangvin renal.

Majoritatea lectinelor ce se găsesc în alimentație nu sunt foarte periculoase, deși ele pot cauza o mulțime de probleme. S-a efectuat un studiu (Nachbar and Oppenheim, 1980), în care s-a constatat că 30% din alimentele proaspete și procesate conțin lectine active. Lectinele din frunzele de salată, fructe, mirodenii, semințe, cereale și nuci (chiar și după prăjire) au arătat un nivel înalt de toxicitate. Același lucru poate fi spus și despre uleiurile provenite din plantele ce conțin lectine. Astfel, uleiul nerafinat de soia conține 858-2983 mcg/kg lectine, iar cel rafinat – 24-55 mcg/kg.

În cea mai mare parte dintre cazuri, sistemul imunitar protejează organismul împotriva lectinelor. 95 la sută dintre lectinele pe care le absorbim din dietele noastre tipice sunt îndepărtate de organism, însă cinci la sută dintre acestea sunt filtrate în torentul sangvin, unde reacționează și distrug hematiile și leucocitele. Acțiunile lectinelor în tractul digestiv pot fi chiar mai puternice. La acest nivel, ele creează adesea o puternică inflamație a mucoasei intestinale, iar această acțiune aglutinantă poate mima alergiile alimentare.

Lectinele sunt produse frecvent în plante, conținându-se în cantități mari în cereale și în unele legume, și pot atinge până la 10% din proteina totală din semințe. (Lis, Sharon 1986; Etzler, 1986). Ele sunt implicate în sistemul de apărare a plantelor împotriva dăunătorilor. Ele sunt cunoscute pentru calitățile antinutritive și pot fi toxice chiar și în concentrația natural produsă (Liener, 1986).

Cele mai citotoxice lectine cauzează cel mai des alergii alimentare. În calitate de alergeni alimentari s-au identificat 4 lectine:

- 2 lectine din – grâul *Triticum aestivum* (Smith, Raikhel, 1989);
- 1 din – grâul *Triticum durum* (Raikhel, Wilkins, 1987);
- 1 din arahide – *Arachis hypogaea* (Young et al., 1991).

Fiecare din acești 4 alergeni cauzează retardare semnificativă în dezvoltarea unor insecte precum gărgărița mazării (*Callosobruchus maculatus*). Aglutinina N-acetylglucosaminică (lectină-WGA) a germenilor de grâu este pe lângă toate letala, pentru larva sfredelitorului european al tulpinilor *Ostrinia nubilalis* (European corn borer), chiar și într-o concentrație relativ mică ea inhibă creșterea larvei viermelui sudic al rădăcinilor, ce atacă rădăcina porumbului sudic (*Diabrotica undecimpunctata*, Czaplă, Lang, 1990).

Este evident că o anumită lectină cu specificitate definită pentru un anumit hidrat de carbon nu poate să protejeze planta împotriva tuturor dăunătorilor, fiindcă structurile glycosil ale suprafețelor externe ale diferitor bacterii, fungi, insecte sunt diferite.

Cu toate acestea, vizând eficacitatea înaltă a lectinelor în lupta cu dăunătorii, una dintre sarcinile ingineriei genetice ar deveni cercetarea minuțioasă și ulterior introducerea lectinelor cu țintă specifică în anumite plante, având în vedere că oricum dăunătorii posedă afinitate către anumite plante. Dar scopul de bază rămâne oricum depistarea acelor lectine care să fie în același moment toxice pentru dăunători și inofensive pentru om, animale și insectele benefice.

4.2. Proteine legate de patogenează

Datorită modificării propriului statut fiziologic, plantele au capacitatea de a se autoproteja în cazul diferitor stresuri precum: condiții nefavorabile, acțiunea razelor ultraviolete, metalelor grele, poluanților din atmosferă, aplicarea diferitor substanțe chimice precum fitohormonii, răniri și atacuri din partea bolilor și vătămătorilor. Reacțiile de protecție pe care le dezvoltă plantele în aceste cazuri sunt numite „răspunsuri de protecție”, iar proteinele activ sintetizate în concordanță cu aceste reacții sunt numite „proteine de apărare” (defense-related proteins). Acestea din urmă sunt sintetizate nu numai în locul afectat, ci

și în toată planta. Proteinele de apărare, în special cele specific induse în stări patologice, prezintă un interes deosebit pentru viitorul agriculturii și sunt numite proteine legate de patogeneză (PR proteine).

Proteinele respective au fost identificate în multe specii de plante superioare. Sintetizarea și acumularea lor în plantă s-a păstrat pe parcursul evoluției. În ingineria genetică acestea aduc o contribuție considerabilă datorită faptului că ele pot fi sintetizate de celule direct prin translația unei gene.

Astfel, PR proteinele descoperite în multe specii de plante au fost clasificate în 17 familii (tab. 5). La baza clasificării au fost luate: asemănarea secvențială, serologică și imunologică și proprietățile enzimatic.

Printre alergenii vegetali incluși în „Official Allergen Database” a Uniunii Societăților Imunologice, aproximativ 25% se referă la grupul proteinelor legate de patogeneză⁴. Acestea sunt rezistente la proteoliză și la pH scăzut. Aceste caracteristici și nivelul expresiei plasează PR în grupa substanțelor care provoacă răspuns imun la om la contactul cu mucoasele.’

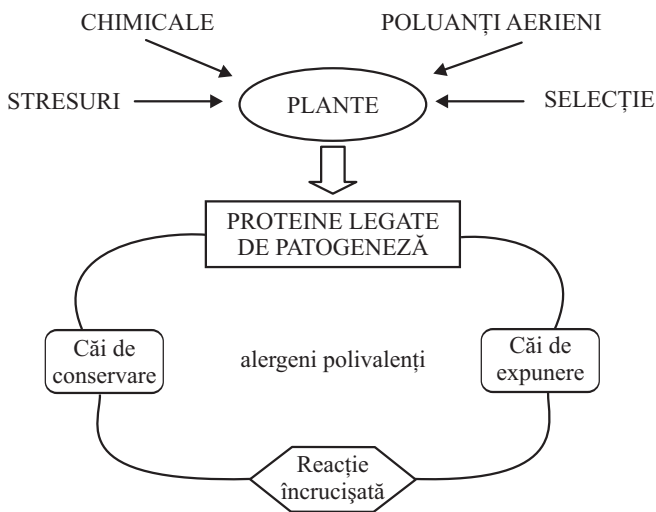


Figura 2. Proteine PR

⁴ Proteinele legate de patogeneză sunt clasificate în 17 grupuri. 7 din aceste grupuri conțin proteine cu proprietăți alergice (2, 3, 4, 5, 8, 10, 14) și celelalte conțin alergeni alimentari.

Asemănarea în secvența aminoacizilor face ca PR-proteinele să provoace reacții încrucișate, pentru alergenii din diferite plante. Expresia indusă, de către factorii de mediu, a alergenilor caracteristici PR-omoloage, poate explica diversitatea alergiilor. Poluanții antropogeni de asemenea influențează expresia alergenilor PR-proteinelor (Midoro-Horiuti T., Brooks EG, Goldblum R.M., *Patogenesis-related proteins of plants as allergens. Ann allergy asthma immunol*, 2001 oct.; 87 [4]: 261-71).

Spre exemplu, proteinele care au epitopi comuni cu Bet v. 1 (alergen major al polenului) se întâlnesc în polenul câtorva specii de meri, țelină, morcovi, nuci și soia. Pacienții alergici la polen prezintă deseori alergii la ingestia anumitor fructe și legume, precum și la produsele derivate din acestea. Spre exemplu, proteinele care au epitopi comuni cu Bet v1 (alergen major al polenului) se întâlnesc în polenul câtorva specii de meri, țelină, morcovi, nuci și soia.

Tabelul 3. Alergeni alimentari și inhalatorii cu omologie secvențială cu proteine PR clasa PR 10

ALERGENUL ⁵	Proteina PR ⁶ cu o semnificativă omologie secvențială ⁷ cu alergenii înregistrați
Alergenul alimentar Mal d I, <i>Malus domestica</i> (măr)	PI49/p I176 <i>Pisum sativum</i> (mazăre) PvPR 1/2 <i>Phaseolus vulgaris</i> (fasole) PcPR 1-1 <i>Petroselinum crispum</i> (pătrunjel)
Alergenul inhalator Bet v I, <i>Betula verrucosa</i> (mesteacăn)	STH2 <i>Solanum tuberosum</i> (cartof)
Alergenul inhalator Aln g I, <i>Alnus glutinosa</i> (arin negru)	
Alergenul inhalator Cor a I, <i>Corylus avellana</i> (alun)	

Consequences of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicology and allergenicity.

S. L. Franck-Oberspach and B. Keller. *Plant breeding* 116, 1-17 (1997).

⁵ Omologie în limitele alergenilor inhalatori înregistrați: 80-90%

⁶ Alte proteine PR înregistrate ce aparțin familiei PR-10. Omologie în limitele rândurilor proteinelor PR de la 37% până la 64%.

⁷ Identitatea secvențială între Mal d I și Bet v I este de 56% (63% cu izoformul BV1SC AL Bet v I) la nivelul proteic. Identitatea secvențială între Bet v I și p I49 este de 55% (70% incluzând schimbările conservative) la nivelul proteic. Identitatea secvențială între Bet v I și PvPR I este de 44% la nivel proteic.

Pacienții alergici la polen prezintă deseori alergii la ingestia anumitor fructe și legume și la produsele derivate din acestea. Majoritatea reacțiilor se datorează celor 4 structuri de reacție încrucișată⁸ prezente în polenul de mesteacăn (*Betula verrucosa*). Teoretic, alergenii asemănători după structură cu alergenii din polenul de mesteacăn sunt termolabili și practic sunt distruși în timpul pregătirii produselor sau în procesul de digestie, spre deosebire de alergenii clasici alimentari, însă oricum există cazuri de reacții alergice la persoanele sensibile.

Tabelul 4. Aspecte clinice ale alergiilor alimentare

Cavitatea bucală	Sindromul oral alergic (prurit și edem al buzelor, cavitații bucale și limbii)
Tractul gastro-intestinal	Vomă, crampe, diaree, dureri abdominale
Pielea	Urticarie, dermatită atopică, edem vascular
Aparatul respirator	Astm, rinită, bronhospasm
Aparatul cardio-vascular	Prăbușirea presiunii arteriale, anafilaxie

Conform studiilor efectuate, culturile care conțin aceste proteine provoacă „Sindromul Oral Alergic” (OAS), cauzat de reactivitatea încrucișată între proteinele din legumele și fructele proaspete și polen (tab. 4). Acest sindrom este prezent la 70% din persoanele cu alergii la polen. Manifestările clinice ale OAS sunt: senzație de arsură, usturime, prurit, uneori edematierea buzelor, limbii, cavitații bucale, faringelui, care apar la ingestia fructelor sau a legumelor proaspete. Aceste simptome persistă de la câteva secunde până la câteva minute și rareori progresează. Totuși studiile reflectă că 9 % din persoanele cu OAS au în anamneza simptome severe ale alergiilor alimentare, iar 2% - au suportat șoc anafilactic.

⁸ Secvența aminoacidizilor N-terminali la măr, cireșe, morcovi are o identitate de 28-67% cu Bet v 1; identitate de 36-66% cu proteina PR din pătrunjel. Astfel, persoanele alergice la polen dezvoltă și alergii la fructe și legume (Vieths et al., 1996).

Tabelul 5. *Clasificarea proteinelor legate de patogeneză*

Familiiile	Membrii	Proprietăți	Simbolul genei	Referință
PR-1	PR-1a din tutun	Antifungic; 14-17kD	Ypr1	Antoniw ș. a., 1980
PR-2	PR-2 din tutun	b-1,3-glucanaza, 25-35 kD	Ypr2	Antoniw ș. a., 1980
PR-3	P, Q din tutun	Chitinaza tip I, II, IV, V, VI, VII; 30 kD	<i>Ypr3, Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	R din tutun	Antifungic, chitinaza tip I, II; 13-19 kD	Ypr4, Chid	Van Loon, 1982
PR-5	S din tutun	Antifungic, tip taumatina	Ypr5	Van Loon, 1982
PR-6	Inhibitor I din tomate	Inhibitor al proteinazei; 6-13kD	Ypr6, Pis	Green și Ryan, 1972
PR-7	P 69 din tomate	Endoproteaza	<i>Ypr7</i>	Vera și Conejero, 1988
PR-8	Chitinaza din castravete	Chitinaza tip III	<i>Ypr8, Chib</i>	Metraux ș. a., 1988
PR-9	Peroxidaza producătoare de lignină din tutun	Peroxidaza	<i>Ypr9, Prx</i>	Lagrimini ș. a., 1987
PR-10	PR1 din pătrunjel	Ribonucleaza, Proteina Bet-v1	<i>Ypr10</i>	Somssich ș. a., 1986
PR-11	Chitinaza clasa V din tutun	Chitinaza tip I	<i>Ypr11, Chic</i>	Melchers ș. a., 1994
PR-12	Rs-AFP3 din ridiche	Defensina	<i>Ypr12</i>	Terras ș. a., 1992
PR-13	THI2.1 din arabidopsis	Tionina	<i>Ypr13, Thi</i>	Epple ș. a., 1995

PR-14	LTP4 din orz	Proteina transferului lipidic	<i>Ypr14,Ltp</i>	Garcha-Olmedo ș. a., 1995
PR-15	OxOa din orz	Oxalat-oxidaza	<i>Ypr15</i>	Zhang ș.a.,1995
PR-16	OxOLP din orz	Tip oxalat-oxidaza	<i>Ypr16</i>	Wei ș. a., 1998
PR-17	PRp27 din tutun	necunoscut	<i>Ypr17</i>	Okushima ș. a., 2000

Deci alergiile alimentare reprezintă una dintre cele mai serioase probleme la momentul actual datorită impactului asupra sănătății. Acesta poate varia de la efecte minore până la efecte foarte severe.

Alergiile alimentare sunt cauzate de interacțiunea componentelor alimentare cu sistemul imun. Cei mai importanți factori care determină gravitatea reacțiilor alergice sunt: tipul alergenului, starea și constituția persoanei afectate și circumstanțele consumului unui anumit produs.

Orice proteină nouă introdusă în lanțul alimentar este un nou potențial alergen. Majoritatea celor mai importanți alergeni alimentari au caracteristici comune: masa moleculară cuprinsă între 10 și 70 kD, termostabilitate, rezistență la procesele de digestie, proteoliză și hidroliză, hidrosolubilitate.

Posibilitatea ingineriei genetice de a produce variate modificări ale produselor sau ale plantelor alimentare determină modificarea potențialului alergic, astfel evaluarea riscurilor și studierea proprietăților alergice sunt vital importante.

4.3. Modificarea toxicității plantelor

Atât în antichitate cât și în prezent, plantele au fost și sunt o importantă sursă de hrană pentru om. Prin încercări și erori, oamenii au învățat că numai anumite plante pot fi consumate fără pericole pentru sănătate și viață. Pe parcursul evoluției, ei au realizat, de asemenea, că unele plante pot fi consumate numai după preparare. Cunoștințele despre siguranța alimentară au fost transmise din generație în generație, astfel încât pe parcursul ultimului secol, în special ultimii 50 de ani, cu ajutorul analizelor chimice și testelor de toxicitate oamenii au aflat cauzele și constituenții toxicității multor plante.

Așadar, pe lângă componentele nutritive, plantele conțin și substanțe toxice. Aceste substanțe (tab. 2) sunt sintetizate pentru protecție împotriva dăunătorilor și a microbilor. Aici putem menționa și dependența toxicității de doză, astfel încât o doză mică poate avea efecte benefice asupra organismului, iar dacă aceasta depășește un anumit nivel, devine otrăvitoare. Din această cauză se recomandă de respectat cantitatea anumitor plante folosite pentru consumul alimentar. Majoritatea acestor toxine sunt prezente în alimentele obișnuite, dar cantitatea lor este nesemnificativă, astfel ele nu produc intoxicații. În altele, de exemplu în cassava, nivelul substanțelor toxice este înalt de aceea ea prezintă pericol pentru om.

Tablelul 6. *Toxine naturale ale plantelor de cultură (Holm ș. a., 1998).*

Denumirea plantei	Toxina	Localizarea toxinei
Grâu	Durină	Părțile vegetative tinere
	Lectine	
	Inhibitori ai proteazelor	Boabe
Orez	Inhibitor al tripsinei	Boabe
Porumb	Glicozide cianogene	Părțile vegetative tinere
	Inhibitor al tripsinei	Boabe, știuleți
Orz	Epiheterodendrin	Părțile vegetative tinere
	Inhibitor al tripsinei	Boabe
Soia	Saponine	
	Lectine	
	Coumestrol	
	Daidzeină	Semințe
	Genisteină	Semințe
	Inhibitori ai proteazelor	
Sorg	Durină	Plante tinere
Cassava	Linamarină*	Tuberculi
	Lotaustralină*	
	Inhibitori ai proteazelor	
Cartof	Alfa-chaconină**	Tuberculi
	Alfa-solanină**	
Tomate	Alfa-tomatină	
	Nicotină	
	Lectine	

Rapiță	Glucozinolați	
	Acid erucic***	
	Saponine	
	S-metil-L-cistein sulfoxid	Aminoacid toxic
Cicoare	Lectine	Frunze și rădăcini
	Lactucină	Frunze și rădăcini
	8-deoxilactucină	Frunze și rădăcini

* *Conținutul total de glicoziide nu va depăși limita de 10 mg/kg.*

** *Conținutul total de glicoalcaloizi nu va depăși limita de 200mg/kg la cartofi vechi și 100 mg/kg la cei noi.*

*** *Conținutul total nu va depăși limita de 5% în DK.*

În unele plante, substanțele toxice sunt prezente dintotdeauna, în altele pot fi sintetizate la anumite etape al vieții acestora, pe anumite căi metabolice, sub influența diferitor factori. Probabilitatea activării mecanismelor până atunci pasive sau creșterea activității unuia activ este considerată foarte joasă la plantele obișnuite, dar ea poate deveni înaltă datorită modificărilor genetice. Uneori, aceste mecanisme, silențioase de fapt, pot fi activate de mutații, rearanjamente cromozomiale, sau noi regiuni (porțiuni) regulatorii introduse în procesul de creștere (înmulțire) și toxinele care până atunci nu erau proprii speciei pot fi de acum produse. La fel, toxinele produse în cantități mici pînă la modificarea genetică pot să se producă în cantități mari ca rezultat la această modificare.

Așadar, în ceea ce privește modificarea genetică a plantelor, există 2 aspecte ale toxicității determinate de introducerea în plante a ADN - ului nou și anume:

- 1. Modificări directe** prin (a) producerea substanței toxice noi din momentul modificărilor genetice și (b) schimbarea expresiei cantitative a toxicului deja existent (creșterea sau scăderea), și
- 2. Modificări indirecte**, care duc la producerea sau la acumularea constituienților toxici. Aceste efecte adverse pot apărea ca rezultat al oricărei inserții, pleiotropii (schimbare nedorită și neașteptată cauzată de expresia transgenului) sau variațiuni somaclonale.

Pentru determinarea efectelor adverse ale modificării genetice și preântâmpinarea impactului acestora asupra sănătății umane este important de determinat echivalența substanțială (substantial equivalence) – aprecierea comparativă a plantei MG cu aceeași plantă nemodificată. Adică, sunt efectuate estimări privind prezența anumitor substanțe relevante din punct de vedere toxicologic, dar și din punct de vedere nutrițional. Chiar și cea mai mică diferență

trebuie privită ca indiciu a efectelor nedorite care s-au petrecut în urma modificării.

Din păcate, chiar și această metodă nu ne poate garanta sută la sută lipsa substanțelor toxice nedorite, iar prezicerea efectelor nedorite este imposibilă.

Cel mai evident exemplu de toxicitate a devenit cazul companiei japoneze Showa Denko K. K., care a comercializat suplimentul alimentar triptofan MG. Nivelul crescut de L-triptofan urma să fie obținut datorită bacteriei *Bacillus amloliquefaciens* MG. Suplimentul alimentar a fost comercializat fără a fi testat, deoarece se considera că nu este importantă calea de obținere. Astfel, triptofanul MG a fost considerat identic celui comercializat anterior.

Ca urmare, în 1989, în SUA a avut loc izbucnirea unei patologii necunoscute până atunci, care ulterior a fost numită „sindromul eozinofilie-mialgie”. Pacienții acuzau dureri acute în mușchi și articulații, ulterior și tumefierea articulațiilor. Aceasta boală era asemănătoare cu sclerodermia și practic nu răspundea la tratament. În consecință, a avut loc decesul a 37 de pacienți și invalidizarea a circa 1,5 mii.

Cercetările (Sidransky ș. a.) au demonstrat că în urma transformării, bacteria MG producătoare de L-triptofan a obținut proprietatea de a produce în cantități neînsemnate (mai puțin de 0,1%) etilenbistriptofanul, o substanță extrem de toxică, substanță care a și fost cauza acestui sindrom.

Glucozinolații – substanțe care conferă gust picant muștarului, hreanului. Acțiunea toxică asupra omului se manifestă prin activitate antitiroidiană, dereglări la nivelul tractului digestiv, inclusiv afectarea ficatului.

Saponinele – acțiunea toxică se manifestă prin iritație a mucoasei tractului digestiv (gastroenterite cu anorexie, diaree și scădere ponderală).

Glicozide cianogene – (durina, linamarina, lotaustralina). Intoxicația acută are următoarele semne: respirație și puls accelerat, cefalee, gastralgii, vomă, diaree, confuzie, convulsii. La ingestia unei doze mai mari poate surveni moartea.

în cazul consumului îndelungat al plantelor ce conțin glicozidele cianogene, fără prelucrarea acestora, poate surveni intoxicația cronică urmată de patologii cronice ale sistemului nervos central.

Cazul acesta se complică din cauză că firma Showa Denko a folosit în producerea triptofanului bacteria MG, realizând concomitent o procedură simplificată de purificare. Astfel, până în prezent nu este clar dacă toxicitatea produsului se datorează utilizării bacteriei MG sau purificării insuficiente, mai ales că stocul bacterian modificat genetic nu a fost disponibil pentru investigații. (Australian Gen-Ethics Network, 1994).

Unele substanțe destinate luptei cu dăunătorii pot bloca fermentii tractului digestiv atât la insecte, cât și la om. O serie de soiuri transgenice de porumb, tutun și roșii, rezistente la insecte, sintetizează lignina – o substanță, care împiedică afectarea plantelor. Aceasta se poate descompune în metanol și fenoli, care la rândul lor au o acțiune toxică și mutagenă asupra omului.

Tomate MG (Flavr Savr) au fost obținute prin metoda „antisens”, ele fiind primele plante MG comercializate.

Au fost efectuate teste de toxicitate acută, pentru aceste tomate pe șoareci de laborator.

- Conform datelor histologice, la 7 din 20 de femele s-au depistat leziuni moderate erozive-necrotice ale intestinului și stomacului. Astfel, la om există riscul de dezvoltare a hemoragiilor digestive, în particular la vârstnici și la persoanele care folosesc aspirina ca profilaxie a trombozelor.
- 7 din 40 de șoareci au murit în răstimp de 2 săptămâni din cauze necunoscute.

Cauza toxicității a rămas nepublicată, iar comercializarea acestor tomate a fost sistată din cauza cheltuielilor exagerate de obținere și a calităților gustative nesatisfăcătoare.

Porumb MG – (Chardon LL) rezistent la erbicide cu gena ce codifică enzima Fosfinotricin-acetiltransferaza (PAT-PROTEINA), diferă considerabil de porumbul non MG prin conținutul de grăsimi și hidrați de carbon. Testele de toxicitate au fost efectuate doar pe pat-proteine. În urma experiențelor pe șoareci s-a demonstrat că capacitatea de digestie a scăzut după ingestia de porumb MG.

EXEMPLE DE STUDII

De regulă, studiile care se efectuează asupra plantelor MG se referă la:

1. Integritatea, stabilitatea, numărul de copii și amplasarea transgenului inserat în genomul plantei.

2. Comportamentul genelor străine ce permit inserția transgenului în genomul propriu (promotor și/sau terminator).

3. Comportamentul proteinei transgenice.

În privința stabilității ADN - ului inserat în genomul plantei s-a efectuat un studiu (2003) în privința unei secvențe a acestui transgen în 5 varietăți diferite. Au fost prezentate diferențele între liniile (descendență, filiație) transgenice preconizate și cele prezente în plantele cultivate: absența secvențelor așteptate sau prezența secvențelor neprevăzute de ADN.

Un alt studiu (Universitatea Leeds, 2002) a demonstrat că ADN - ul nu este completament degradat în hrana pentru animale. La om s-a demonstrat persistența ADN - ului transgenic în tubul intestinal și o cantitate infimă transferată, a acestui ADN, bacteriilor din microflora intestinală. Referitor la promotor (secvența care inițiază expresia transgenului), cel mai des folosit este promotorul 35S. S-a demonstrat că acesta poate fi activ în celulele umane (studiile in vivo și alte analize continuă).

În privința proteinelor transgenice, s-au constatat diferențe semnificative între soia convențională și soia transgenică tolerantă la erbicidul RoundUp (RR). Ultima conține o proteină inhibitoare (27%) a unei enzime digestive a sucului pancreatic cu rol de digestie a proteinelor. Efectul rezultat putea fi inhibarea digestiei anumitor proteine cu retardul dezvoltării animalelor.

De asemenea, s-a demonstrat (P. Chowdhury, 2003) că proteina transgenică Cry1Ab persistă în organismul uman după consum.

La al 46-lea Simpozion de histochimie, Praga, 2004, de echipa d-lui pr. Malatesta, Universitatea Urbino, Italia a fost prezentat un studiu care demonstrează că alimentarea șoarecilor cu soia transgenică, tolerantă la gliofosfat, timp de 1-5 săptămâni, induce perturbări în testicule: modificări ale activității enzimatică, modificări ale celulelor Sertoli (implicate în funcția hormonală). Autorii precizează totuși că aceste efecte pot fi datorate gliofosfatului prezent în plante după aplicarea erbicidului Round Up, dar există și posibilitatea inducerii acestor efecte de către modificările genetice ce au avut loc în plantă.

S-a efectuat un studiu pe șoareci înțărcați, ulterior alimentați timp de 3 luni cu soia MG. Au fost fixate datele microscopiei electronice în ceea ce privește schimbările la nivelul nucleelor celulelor. Apoi șoarecii au fost transferați la alimentație cu soia non MG timp de 1 lună. Schimbarea regimului alimentar a provocat reîntoarcerea la caracteristicile inițiale ale nucleelor.

În paralel, pentru a evalua influența soiei MG asupra integrității fizice a indivizilor adulți, un grup de șoareci alimentați cu soia non-MG au fost trecuți la un regim cu soia MG. În urma examenului microscopic s-au constatat aceleași modificări ca și în primul caz: nucleele hepatocitelor sunt de forma rotunda, cu puncte de condensate de ADN repartizate la periferie. În nucleolii de la al II - lea grup de șoareci s-au depistat centre de fibrilare și abundența de compuși fibroși denși, în timp ce la I grup nucleolii erau mult mai compacți, cu mai puțini compuși fibroși denși.

În general, diminuarea suprafeței nucleului și creșterea frecvenței porilor sunt indicatori ai creșterii metabolismului. Suprafața nucleului, care s-a dovedit a fi inferioară la șoarecii alimentați cu soia MG se păstrează în caz de schimbare a regimului alimentar. Însa, după cum precizează autorii, regimul respectiv afectează în principal compoziția structurală a nucleului.

Există oare posibilitatea de a regăsi în produsele animaliere proteine transgenice, provenite din plantele MG, cu care au fost hrănite animalele respective?

În 1997, echipa profesorului Doerfler a Institutului de Genetică al Universității din Koln a demonstrat pasajul ADN-ului microorganismului M13 în sângele, ficatul și splina șoarecilor.

În 2001, experiențele profesorului Einspanier de la Institutul de Fiziologie al Universității din München a demonstrat prezența secvențelor ADN din soia și porumbul MG în limfocitele și duodenul vacilor hrănite cu acestea.

Astfel, unii savanți admit posibilitatea transferului de ADN de la plantele furajare către organele animalelor. În urma acestor rezultate s-a pus problema prezenței ADN-ului transgenic în laptele acestor vaci. Un răspuns la aceasta poate fi publicația echipei profesorului Poms (2003, Universitatea Științelor Agricole, Viena, Austria), care conchide că transferul ADN-ului dintr-un aliment digerat de un animal nu poate fi depistat în laptele acestuia.

Pentru a obține rezultate mai veridice, în prezent se dă preferință studiilor sângelui.

Un alt studiu a fost efectuat de către echipa profesorului Chowdhury, Institutul Național pentru Sănătatea Animalelor, Japonia. Rezultatele acestuia au pus în evidență persistența ADN-ului și proteinelor de origine transgenică în organele porcinelor. Testele s-au petrecut pe porci hrăniți cu Bt-porumb. S-a descoperit prezența urmelor genei care codifică proteina Bt în stomac, duoden, rect și fecale.

În fine, s-a efectuat și un studiu pe om (publicat în 2004 de către echipa profesorului Netherwood, Universitatea Newcastle). Rezultatele au demonstrat că anumite gene introduse în soia MG supraviețuiesc în condițiile digestiei din intestinul subțire al omului, în special gena „**epsps**” care conferă toleranță la glifosfat. Aceste gene dispar, totuși, după pasajul lor în intestinul gros.

Aceste rezultate trebuie luate în considerare pe viitor, căci aceste gene care persistă în intestin pot fi transferate microorganismelor prezente în organismul uman sau animal și să crească numărul microorganismelor patogene, spre exemplu al celor rezistente la anumite antibiotice.

PROPRIETĂȚI CANCEROGENE

OMG pot deveni cancerogene și mutagene din cauza capacității de cumulare a erbicidelor, pesticidelor și produșilor de descompunere ai acestora. De exemplu, erbicidul glifosfat utilizat în prelucrarea sfeclii de zahăr și a bumbacului MG este cancerogen și poate declanșa dezvoltarea limfomului.

În urma diferitor procese intracelulare la soiurile MG de orez și tutun cu productivitate înaltă se acumulează substanțe biologice active, capabile să provoace diverse tumori. În 2000, 2 cercetători americani (Daniel Doerge, Daniel Sheehan) au relatat rezultatele unui studiu în privința efectelor cancerogene ale soiurilor MG: creșterea riscului cancerului mamar la femei, afectarea cerebelară la bărbați și anomalii la copii.

MUTAȚII

Mulți savanți sunt de părerea că OMG sporesc riscul mutațiilor. Nu este exclus că ADN-ul transgenic să se acumuleze în organele interne ale omului să nimerască, de asemenea, în nucleele celulelor embrionului uman, ceea ce poate duce la malformații și chiar la moartea acestuia.

Efectele mutagene pot apărea și din cauza erbicidelor, care se acumulează în plantele MG rezistente la erbicide. În această privință, cercetătoarea dr. biolog Irina Ermakova a efectuat un experiment la Institutul de Neurofiziologie și Studiul Activității Nervoase Superioare de pe lângă Academia de Științe Rusă. Nouă femele de cobai au fost împărțite în 3 grupe de câte 3 – o grupă de control, o grupă în a cărei hrană s-a adăugat făină de soia modificată genetic și o grupă, care a consumat alimente amestecate cu făină de soia obișnuită.

Au fost numărate femelele care au născut și numărul de cobai născuți vii și morți. După primul stagiu, cobaii au fost împărțiți în două grupe, una hrănită cu făină de soia modificată genetic, cealaltă hrănită cu făină de soia obișnuită.

A rezultat un număr anormal de mare de decese printre urmașii femelelor hrănite cu soia modificată genetic (tab. 8). În plus, 36% dintre aceiași cobai cântăreau mai puțin de 20 de grame, fapt care evidențiază starea lor de extremă slăbiciune. Acesta este primul studiu care a demonstrat o dependență clară între hrănirea cu alimente modificate genetic și starea de sănătate a urmașilor.

„*Morfologia și structurile biochimice ale cobailor sînt foarte asemănătoare cu cele ale oamenilor, ceea ce este extrem de îngrijorător în ceea ce privește efectele asupra mamelor și copiilor nenăscuți, mai ales în contextul în care se urmărește introducerea de cât mai multe OMG - uri în alimentația umană, din rațiuni comerciale*”: a declarat în concluzie Ermakova.

Tabelul 8. *Analiza comparativă a impactului OMG - urilor asupra natalității cobailor*

Femele care au născut	Cobai născuți vii	Cobai morți (3 săptămâni)	Procentul deceselor	Cobai în viață
Grupă de control (4 din 6)	44	3	6,8 %	41
Cu soia modificată genetic (4 din 6)	45	25	55,6 %	20
Cu soia obișnuită (3 din 6)	33	3	9 %	30

De asemenea, cercetările au demonstrat că la șobolanii care au fost alimentați cu cartof MG, s-a înrăutățit compoziția sângelui, au fost depistate anomalii ale dimensiunilor organelor interne. La majoritatea animalelor decedate au fost depistate patologii ale intestinului subțire și intestinului gros.

Studiul realizat în cadrul Universității de Agronomie „Vavilov” din Saratov (capitala regională de pe fluviul Volga) a demonstrat prezența modificărilor patologice severe la cobaii hrăniți cu soia MG. Maria Konovalova, inginer biotehnolog, realizatoarea studiului în cauză, cu supervizarea profesorului V. Blinov, a raportat la o conferința de presă faptul că o varietate de soia MG rezistentă la erbicidul *RoundUp Ready* al companiei Monsanto (40-3-2), aprobată pentru consum uman în Federația Rusă și în multe alte țări, a indus serioase schimbări în morfologia unor organe interne (ficat, rinichi, testicule), inclusiv la nivel celular, la cobaii studiați.

Soia MG a fost, de asemenea, găsită drept cauză a mortalității infantile, precum și a creșterii agresivității și pierderii instinctului matern. Șoarecii care au fost hrăniți cu proteine de la soia MG au dat semnale clare de comportament diferit și creștere a greutateii unor organe interne. Unele dintre femelele care făceau parte din grupa cu regim alimentar modificat genetic și-au sufocat puii.

„De asemenea, am identificat anormalități la puii de șoareci ale căror mame au fost hrănite cu soia modificata genetic”, a declarat Maria Konovalova. Dumneaei a făcut publice două fotografii realizate în timpul studiului: una cu un șoarece tipic, din grupa experimentală hrănită cu soia MG pe o perioadă de 5 luni și o alta cu un șoarece din grupa hrănită cu soia convențională. Diferența în raportul de greutate a fost vizibilă, șoarecele hrănit cu soia MG arătând ca subnutrit.

4.4. Rezistență indusă la antibiotice

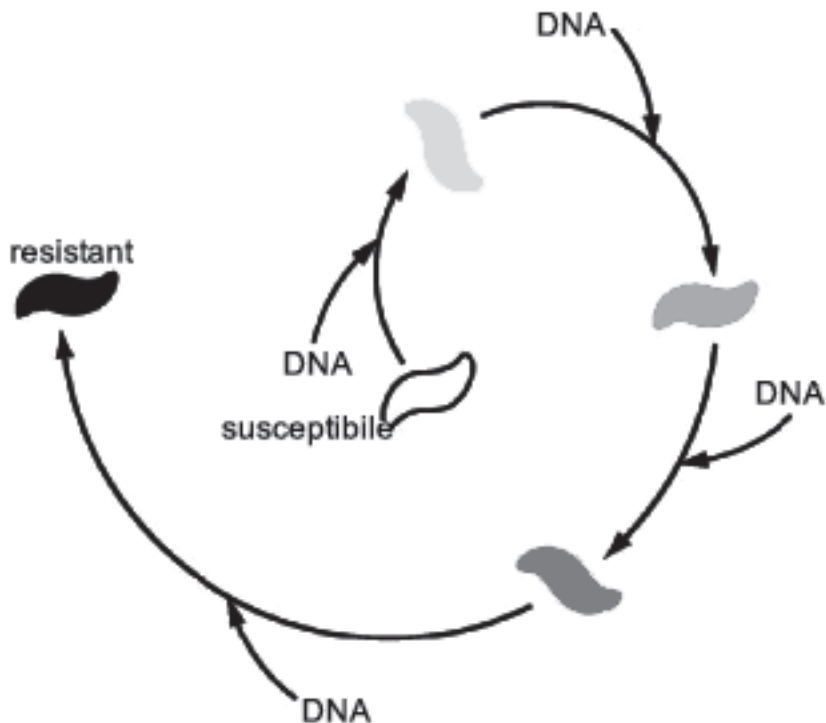
Antibioticele sunt substanțe care distrug bacteriile sau le opresc înmulțirea. Ele sunt anticorpi naturali, produși de anumite mucegaiuri, pentru a combate bacteriile – competitorii acestora.

Unele specii de bacterii „au învățat” să dezactiveze antibioticele, ele având gene care le fac rezistente la acestea. Gena rezistenței la antibiotice este o genă care codează enzima responsabilă de degradarea antibioticului specific până la bioproduși inofensivi, protejând astfel bacteria.

Răspândirea genelor rezistenței la antibiotice este rezultatul selecției clonelor rezistente la prezența antibioticului și transmiterii active intergenetice a genelor rezistente (transferul genetic pe orizontală)⁹, Mazodier și Davies, 1991; Lorenz și Wackernagel, 1994. Este recunoscut faptul că utilizarea largă a antibioticelor în tratamentul oamenilor și animalelor, de asemenea utilizarea lor ca aditivi alimentari în hrana pentru animale pe parcursul ultimelor decenii, a contribuit la creșterea frecvenței genelor rezistenței la antibiotice la bacterii.

Figura 3. *Evoluția PBP (penicillin binding proteins): de la bacterie cu sensibilitate totală la penicilină la rezistență achiziționată prin recepționarea ADN - ului de la alte specii.*

⁹ Oricare transfer genetic independent ori asincron cu calea de reproducere a organismelor vii (contrar mecanismului: părinte-descendent –, „transfer vertical”) este numit „transfer genetic orizontal”.



Este știut faptul că genele rezistenței la antibiotice au apărut cu milioane de ani în urmă, pe parcursul evoluției bacteriilor, ca rezultat al necesității microorganismelor producătoare de antibiotice de a se autoproteja împotriva propriilor toxine (Davies, 1994) și al coexistenței bacteriilor solului cu diverse microorganisme producătoare de antibiotice.

Așadar, solul a fost rezervorul inițial al genelor rezistenței la antibiotice. De aici bacteriile rezistente au migrat la animale și oameni prin mecanismele *transferului genetic pe orizontală* – *transferul materialului genetic de la un organism la altul fără implicarea mecanismelor de reproducere*.

Un alt rezervor este omul, în special tractul gastrointestinal al acestuia (fig. 4). Contaminarea omului cu bacterii rezistente la antibiotice se produce pe 2 căi:

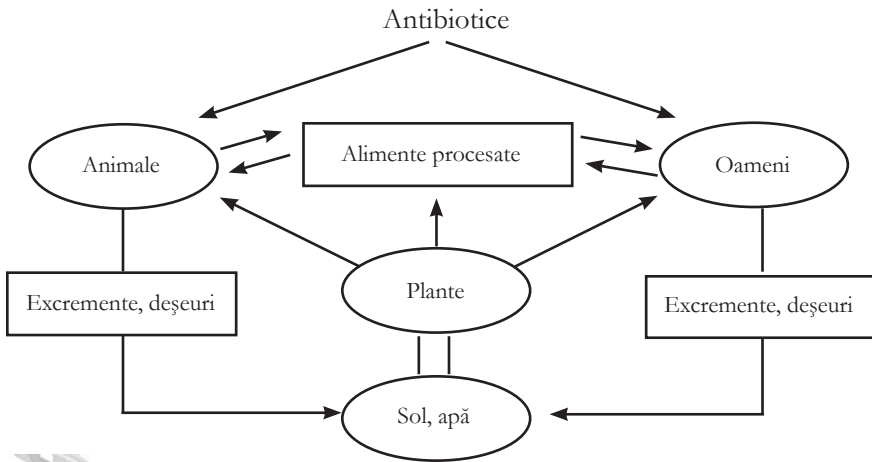
1. Ingestia bacteriilor ce conțin gena rezistenței, prezente în fructele și legumele proaspete (Corbet D., 1988) și în produsele obținute prin fermentare.

2. Contact direct cu alți oameni, animale și sol.

Genele rezistenței la antibiotice sunt utilizate în crearea plantelor MG în calitate de markeri. Aceștia au fost utilizați în timpul procesului de transformare/ selecție pentru obținerea mării majorității a plantelor modificate genetic. Pentru a depista în stadiile timpurii de dezvoltare a plantei MG dacă a avut loc modificarea dorită, specialiștii introduc pe lângă gena dorită și gena rezistenței la antibiotic, adică markerul. Markerul funcționează conform principiului toxină-antidot. Astfel, celulele care au fost modificate cu succes prin ingineria genetică nu vor muri la acțiunea antibioticului, ceea ce demonstrează și inserția calitativă a celeilalte gene (dorite). Așadar, deoarece modificarea genetică este destul de inexactă, geneticienii folosesc gena-marker pentru a stabili dacă inserția genelor a reușit.

Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, March 2001; Safety of Genetically Engineered Crops.

Figura 4. Diseminarea bacteriilor și a genelor acestora în mediul ambiant⁵.



Cum poate gena rezistenței la antibiotice din plantele MG să inducă rezistența la antibiotice la om?

Cea mai mare îngrijorare în legătură cu folosirea markerilor este diminuarea eficacității terapiei cu antibiotice la om și la animale. OMS în 2001 a avertizat că oamenii manifestă deja rezistență la diferite antibiotice, ceea ce îi face mai vulnerabili la maladiile severe.

¹⁰ ○ - biotop □ - rezervoare temporare

Se presupune că ar exista posibilitatea ca bacteriile din intestinul omului și al animalelor să preia gena rezistenței din ADN-ul plantei MG înainte de degradarea totală a acestuia. Respectivul risc crește dacă omul sau animalul consumă în același timp și un antibiotic specific, fiindcă presiunea selecției va influența și mai mult bacteria să achiziționeze gena respectivă.

Pentru diminuarea riscului dezvoltării rezistenței la antibiotice, consiliul de experți EFSA a instituit următoarele criterii de evaluare a genelor rezistenței la antibiotice:

1. Importanța medicală a antibioticului.
2. Folosirea curentă a acestuia în medicina umană și veterinară.
3. Eficacitatea antibioticului în ceea ce privește deținerea controlului asupra bolilor și proceselor infecțioase.
4. Distribuirea naturală a cazurilor particulare de antibioticorezistență a microorganismelor, modul apariției și dezvoltării acesteia în sol, apă și tractul digestiv al omului și al animalelor.

Astfel, conform acestor criterii, autorizare pot obține plantele MG ce conțin gena rezistenței la un antibiotic deja larg răspândit în natură și la antibiotice neefective care nu se mai folosesc de mult în medicină.

Există și un alt aspect al acestei probleme – genele rezistenței la antibiotice urmează să fie evaluate în mod diferit. Consiliul OMG al EFSA le clasifică în 3 grupe:

Grupa I – GRA răspândite printre microorganismele din mediu. Antibioticele specifice pentru GRA I au o importanță minimă în medicina de astăzi. Această grupă include gena *nptII* (rezistență la kanamicină)⁷ și gena *hpt* (rezistență la higromicină). Experții EFSA aprobă plantele ce conțin *nptII* pentru cultivarea de mai departe și experiențe.

Grupa II – GRA larg răspândite printre microorganismele din mediu. Însă antibioticele asociate continuă să fie folosite în tratamentul anumitor boli. Aceasta se referă la genele:

- *am^r* (rezistența la ampicilină)⁸,
- *aad* (rezistența la streptomycină),
- *cm^r* (rezistența la cloramfenicol).

⁷ Gena *amp^r* conferă rezistență la ampicilină și provine din bacteria *E. coli*, fiind folosită în porumbul MG Bt176.

⁸ Gena *amp^r* conferă rezistență la ampicilină și provine din bacteria *E. coli*, fiind folosită în porumbul MG Bt176.

Experții EFSA recomandă utilizarea acestor gene în câmp doar în cazul experiențelor strict necesare.

Grupul III – GRA ce conferă rezistență la antibioticele de o importanță majoră pentru medicină. Spre exemplu, gena *nptIII*, care induce rezistența la amikacină.

Experții EFSA recomandă utilizarea acestei gene doar în cadrul experiențelor de laborator.

Există însă câțiva factori care sugerează că riscul poate fi foarte mic. Într-adevăr, teoretic, bacteriile sunt capabile să absoarbă genele plantelor, dar în condiții naturale această posibilitate este foarte mică. În prezent nu sunt descrise cazuri de preluare la nivelul stomacului, de asemenea și în condiții speciale de laborator. Conform diferitor cercetări, este necesară prezența unui șir de factori care să determine bacteria nu numai să încorporeze gena străină, ci și să manifeste informația genetică. Doar astfel gena rezistenței la antibiotice poate deveni efectivă. Probabilitatea încorporării de către o bacterie a unei gene de la plantă este de la 1:1 bilion până la 1:100.000 bilioane.

TRANSFERUL GENETIC PE ORIZONTALĂ

Cu privire la plantele modificate genetic, WHO a ajuns la concluzia că „nu există o evidență înregistrată pentru transferul de gene de la plante la microorganismele din intestin” și că nu există rapoarte autentificate asupra transformării bacteriene în mediul tractului GI uman. Acest fapt s-a bazat pe concluzia fermă că transferul genelor de rezistență la antibiotice este puțin probabil să aibă loc, dată fiind complexitatea etapelor cerute pentru transferul genic, expresia și impactul eficienței antibiotice.

Transferul genetic pe orizontală depinde de mai mulți factori. Astfel, pentru a avea loc transferul de gene, trebuie să aibă loc următoarele evenimente:

- ADN-ul vegetal trebuie să fie eliberat din celule/ țesuturi vegetale în forma integrală și să supraviețuiască în condițiile de mediu ostile ale tractului GI, inclusiv expunerea la acidul gastric și nucleaze. De regulă, când ADN-ul este eliberat din celulă el este supus acțiunii anumitor enzime, fiind dezintegrat.
- Microorganismele recipiente trebuie să fie competente pentru transformare.
- Microorganismele recipiente trebuie să lege ADN-ul pentru transformare.
- ADN-ul trebuie să penetreze peretele celular și să traverseze membrana celulară.

- ADN-ul trebuie să reziste la sistemul de restricție/ modificare produs de microorganism, pentru a degrada ADN-ul străin.
- ADN-ul trebuie să se integreze în plasmida sau genomul gazdă și necesită cel puțin 20 p. b. pentru o secvența ADN-ul omoloagă completă, în vederea recombinării la ambele capete ale ADN-ului străin.
- Integrarea poate avea loc prin recombinare, dar aceasta e posibil numai dacă se întâlnesc părțile necesare, adică secvența ADN-ului a genei rezistente la antibiotic trebuie să corespundă strict cu gena bacteriană.
- Translarea informației genetice la proteine.
- Informația genetică este transmisă anumitor proteine, care conferă rezistență la un anumit antibiotic. Pentru aceasta gena trebuie să posede un semn de recunoaștere, „recognition signals”, pentru a putea fi citite de bacterie.

Totuși, în pofida faptului că procesul de transfer genetic pe orizontală pare a fi anevoios, exista factori, care ar putea facilita acest proces, și anume paraziți genetici: virusuri, plasmide, elemente mobile. Paraziți genetici, având capacitatea de a traversa limitele speciilor și barierele ecologice, pot servi și ca transportatori ai materialului genetic:

1. Majoritatea acestora au capacitatea de a invada și a insera propriul ADN în cromozomii oricărui tip de celulă, cu o posibilă ulterioară dezordine la nivel genetic și metabolic.
2. Ei sunt „special” construiți pentru a sparge barierele de specie. În tranzit, ei pot lua cu sine și transfera gene de la noul organism-gazdă la parazitul genetic sau invers.
3. Pot căpăta rezistență genetică, astfel reprezentând noi probleme în sănătatea publică (rezistența la antibiotice a bacteriilor patogene sau toleranța la erbicide a buruienelor).

Subiectul markerilor rezistenței la antibiotice este țintă permanentă a controverselor. De aceea, autoritățile împreună cu experții au recomandat ca în viitor plantele MG să fie obținute fără aceștia. Astfel, o noua tendință este acela de a crea markeri selectivi noi care ar înlocui markerii rezistenței la antibiotice (Kunkel ș. a., 1999; Stein și Hansen 1999). Două din exemplele aflate în faza de cercetare sunt: sistemul în bază de citokine (Chua ș. a., 1999) și markerul selectiv în bază de manoză creat de Novartis (Privalle ș. a., 2000).

Tabelul 9. Genele rezistenței la antibiotice, cel mai des folosite în ingineria genetică la plante

Gena rezistenței la antibiotice	Antibiotic
<i>amp^rbla TEM1</i>	ampicilina, amoxicilina
<i>aad</i> sau <i>ant(3'')-Ia3</i>	streptomicina spectinomycină
<i>aph(3')-II</i> sau <i>npt II</i>	neomicina, kanamicina
<i>aph(3')-III</i> sau <i>npt III</i>	amikacina, neomicina, kanamicina
<i>hgh</i> sau <i>hpt</i>	hygromicina
<i>cm^r</i> sau <i>cat</i>	cloramfenicol

(The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation. Ph. Gay).

Abrevieri:

bla = beta-lactamaza

aad = aminoglicozidadeniltransferaza

ant = aminoglicozidnucleotidtransferaza

aph = aminoglicozidfosfotransferaza

npt = neomicinofosfotransferaza

hpt = hygromicinofosfotransferaza

cat = cloramfenicolacetiltransferaza

Tabelul 10. Genele rezistenței la antibiotice în culturile transgenice aprobate

Gena	Uniunea Europeană	SUA
<i>Bla</i>	porumb	porumb
<i>nptII</i>	porumb	porumb
<i>nptIII</i>	rapiță	rapiță
<i>nptII</i>	cicoare	cicoare
<i>nptII, aad, cat</i>		tomate
<i>nptII</i>		bumbac
<i>nptII</i>		cartof
<i>nptIII</i>		dovleac
<i>nptII</i>		in
<i>nptII</i>		papaia

(The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation. Ph. Gay).

Conform datelor din tabelul de mai sus, putem conchide că gena rezistenței la kanamicină este cel mai important marker folosit în ingineria genetică la ora actuală. Aproape 90% din plantele aflate în cercetare conțin acest marker.

În viitorul apropiat și pe termen mediu utilizarea markerilor genelor rezistente la antibiotice în ingineria genetică a plantelor va fi limitată la următoarele gene:

- a) gena *bla* TEM1. Aceasta este prezentă în porumbul MG Novartis 176 comercializat în SUA și Canada, de asemenea înregistrat în UE;
- b) gena *nptII*, prezentă în câteva plante înregistrate în SUA, în special rapița AgrEvo Topaz 19/2, înregistrată și în UE. Această genă de asemenea este prezentă în culturile aflate la stadiu de experiențe;
- c) gena rezistenței la hygromicina *hpt* încă nu este prezentă în plantele MG înregistrate, dar această situație se poate schimba pe viitor. În calitate de confirmare poate servi faptul că 10% din plantele MG aflate în stadiu de studiere conțin acest marker.

5. APORTUL BENEFIC AL UTILIZĂRII OMG

În 1885 un savant pe nume Roux a demonstrat că celulele embrionului de pui pot fi menținute vii în afara corpului. În următorii o sută de ani, progresul biotehnologiilor celulare a cunoscut o dezvoltare fascinantă în numeroase domenii, de la ceasurile biologice la terapia cancerului.

Anticorpii monoclonali pot servi ca instrumente noi pentru detectarea și localizarea moleculelor specifice. De fapt, anticorpi monoclonali pot fi produși împotriva oricărei macromolecule pentru a o localiza, purifica sau distruge, ca în cazul tratamentului cancerului.

Tehnologiile ADN-ului sunt folosite în rezolvarea multor crime. De asemenea, există posibilitatea creării băncilor de ADN, ARN, proteine și de cartare a genomului uman. Markerii sunt utilizați la sinteza ADN și ARN specifici, în special pentru identificarea secvențelor vinovate de anomaliile genetice.

Prin intermediul ingineriei genetice, sunt sintetizate proteine, care pot fi introduse în genomul plantelor sau animalelor, obținând astfel plante rezistente la boli și capabile să trăiască în mediu ostil. Fiind introduse în bacterii, aceste proteine pot produce antibiotice noi și alte medicamente utile.

Tehnicele de clonare generează mari cantități de proteine umane pure, care sunt folosite în tratamentul diferitor maladii, ca de exemplu diabetul. În viitor va deveni posibilă crearea băncilor de proteine umane rare sau de alte molecule necesare. Va fi posibilă păstrarea segmentului de ADN care este modificat

pentru a corecta o mutație, pentru a majora sinteza unei proteine specifice sau pentru a produce o proteină nouă. Aceste tehnici vor juca probabil rolul cheie în terapia genetică.

5.1. Agricultură și industria alimentară

Una din problemele importante pentru țările în curs de dezvoltare rămâne a fi malnutriția proteică, de asemenea carențele în fier, iod, zinc și vitamina A. Există milioane de persoane care manifestă semne clinice de deficiență de oligoelemente sau carență de vitamine, țările Asiei de Sud fiind pe primul loc. UNICEF a estimat un număr de 124 mln. De copii afectați în 1992. În fiecare an din cauza carenței vitaminei A 5 mln. de copii suferă de xeroftalmia și 500 000 devin orbi (Asia de Sud).

După ce ani de zile s-au obținut organisme modificate genetic în beneficiul fermierilor și fabricanților de produse alimentare (prima generație de organisme modificate genetic), tehnicile de inginerie genetică au început să fie folosite pentru modificarea calităților nutritive ale alimentelor, ceea ce conduce la apariția celei de a doua generații de organisme modificate genetic, organisme proiectate în beneficiul consumatorilor. Cele mai multe organisme modificate genetic, utilizate drept surse alimentare, aparțin lumii vegetale. În tabelul 11 sunt prezentate plantele care, pe lângă modificările cu scop agricol, prezintă modificări genetice efectuate în scop nutrițional.

Tabelul 11. Caracteristicile plantelor de cultură modificate genetic (după Robinson, 2001)

Planta	Caracteristici de cultivare	Caracteristici nutriționale și de prelucrare
Cassava	Rezistență la virusul mozaicului	Conținut redus de glucozide cianogene
Porumb	Rezistență la boli Rezistență la insecte Rezistență la dăunătorii de depozit	Conținut mai mare de amidon Amidon modificat Conținut ridicat de lizină și triptofan Conținut îmbunătățit de proteină Conținut crescut de ulei și modificarea proporției de acizi grași

Orez	Rezistență la bacterii Rezistență la insecte Rezistență la dăunătorii de depozit Rezistență la boli de natură fungică Toleranță la erbicide Capacitate de fotosinteză crescută	Conținut mai mare de provitamina A Conținut mai mare de fier
Soia	Protecție împotriva insectelor Rezistență la viroze	Compoziție îmbunătățită a uleiului Conținut crescut de vit. E Nivel scăzut de compuși flatulenți
Rapița	Protecție împotriva insectelor Rezistență crescută la boli	Compoziție îmbunătățită a uleiului
Palmier		Compoziție îmbunătățită a uleiului
Cartof	Rezistență la viroze Rezistență la insecte Rezistență la dăunătorii de depozit Rezistență la lovituri Rezistență la boli fungice	Conținut sporit de amidon
Tomate	Rezistență la viroze Rezistență la insecte Rezistență la boli	Conținut crescut de licopen Proprietăți de procesare îmbunătățite
Banane	Rezistență la boli fungice	Coacere întârziată

Astfel, tehnicile de inginerie genetică pot contribui la (Robinson, 2001):

- modificarea proporției de macro- sau micronutrienți;
- eliminarea sau diminuarea conținutului de compuși cu efect nefavorabil asupra sănătății (compuși antinutritivi, toxine, alergeni);

Una dintre primele modificări genetice efectuate cu scop nutrițional a vizat modificarea compoziției uleiurilor, având în vedere eficiența dietelor bogate în acizi grași nesaturați, în special în acid linolenic, pentru normalizarea dislipidemiilor. Uleiul de soia, palmier și rapiță prezintă, în urma modificărilor genetice suferite de plantele din care este extras, un raport îmbunătățit între acizii grași saturați și nesaturați. În aceste condiții, nutriționiștii pot recomanda consumul de astfel de uleiuri pentru a preveni apariția bolilor cardiovasculare și a reduce numărul persoanelor afectate de ateroscleroză.

O altă modificare genetică, ce are atât implicații nutriționale, cât și de fabricație, se referă la modificarea amidonului. Modificarea proporției existente în mod normal între cei doi polimeri conținuți de amidon, amiloza și amilopectina, conduce la obținerea de amidon destinat unor scopuri bine definite, cum sunt îmbunătățirea proprietăților de gelificare sau îngroșare și absorbția redusă a uleiului în timpul procesului de prăjire. De asemenea, „amidonurile modificate” din plantele modificate genetic reduc tratamentele chimice post - extracție pe care acestea trebuie să le sufere pentru a li se modifica structura în concordanță cu domeniul de utilizare. Tot din motive nutriționale, ingineria genetică a fost folosită pentru a obține grâu care permite fabricarea pâinii cu conținut ridicat de amidon rezistent (formă de amidon care exercită efecte benefice asupra stării de sănătate, asemănătoare celor produse de fibrele alimentare).

Ingineria genetică poate fi, de asemenea, utilizată pentru a îmbunătăți compoziția alimentelor de bază din țările sărace din Africa, Asia și America Latină, unde posibilitatea de alegere a alimentelor este limitată, motiv pentru care apar frecvent carențe de macro- și micronutrienți (vitamine, minerale). Spre exemplu, Institutul Federal pentru Tehnologie din Elveția a creat un orez modificat genetic cu conținut ridicat de provitamină A. Acest orez, care are boabe galbene și a devenit cunoscut sub denumirea de „orez auriu”, a fost proiectat special pentru cele circa 700 de milioane de persoane care suferă de carență în vitamina A și care consumă orezul ca hrană de bază (Moraru și Moraru, 2001).

Tehnicile convenționale de obținere a unui astfel de orez nu sunt aplicabile, deoarece nu există nici o varietate de orez care să producă provitamina A în endosperm. Utilizând tehnicile de inginerie genetică, întreaga cale de biosinteză a provitaminei A a fost introdusă orezului, folosind două gene: una provenind de la narcise și alta de la o bacterie.

Produsele de origine animală sunt sursa vitaminei A (retinol), iar cele de origine vegetală conțin provitamina A (beta-caroten). Organismul, de fapt,

Vitamina A mărește rezistența cartilajelor, mucoaselor și a pielii la infecții, ajută la dezvoltarea normală a scheletului și smalțului dentar, precum și la buna funcționare a ficatului, tiroidei și a altor organe.

Un rol deosebit pe vitamina A îl joacă este în funcționarea ochiului, carența respectivă ducând la scăderea capacității de adaptare a ochilor la lumina difuză, în cazuri mai grave putând apărea o ulcerare a mucoasei oculare și chiar a corneei, fapt ce provoacă opacifierea cristalinului și orbirea.

De asemenea, vitamina A intervine la nivelul sistemului imunitar și în integritatea sistemului celular. Acidul retinoic, obținut la oxidarea acesteia, joacă un rol important în reglarea expresiei genomice și în diferențierea celulară.

are nevoie de beta-caroten pentru a-l transforma în retinol activ. Bio-disponibilitatea retinolului depinde de compoziția lipidică a alimentelor. Ca urmare, utilizarea eficientă a beta-carotenului este asociată cu cea a lipidelor. Beta-carotenul este liposolubil, anume forma solubilizată îi permite pasajul în enterocite, locul conversiei acestuia în retinol. Bio-conversia carotenului în retinol se petrece în celulele intestinale și în ficat. Vitamina A circulă în sânge sub formă de retinol, fiind asociată cu o proteină de transport.

Printre metodele clasice de corecție a carenței de vitamină A (suplinirea medicamentoasă și îmbogățirea alimentelor cu vit. A) pot fi utilizate metode de ameliorarea genetică (morcovi, cartofi cu conținut sporit de beta-caroten sau producerea orezului auriu).

Orezul este un produs consumat de jumătate din populația globului.

Este alimentul de bază în 33 de țări în curs de dezvoltare, prezentând 27% din aportul energetic, 20% proteic, 3% lipidic furnizat de alimentație. Conține tiamina, riboflavina, niacina (vitamina grupului B), zinc, în cantități suficiente, dar este lipsit de vit. C, D, și beta caroten (inclusiv datorită decorticării). Orezul brun integru conține cantități neînsemnate de provitamina A (0,1 μg echivalent beta-caroten per gram), în timp ce orezul decortecat nu o conține deloc.

Ținând cont de obiceiul de decorticare a orezului, geneticienii au decis că expresia provitaminei A să fie țintită în endocarp. Procesul se bazează pe utilizarea embrionilor de orez și *Agrobacteriei* pentru a introduce printr-o singură operație de transgeneză gene specifice. Vectorul pB19hpc include

secvențele phytoen-sintetazei (provenită din planta *Narcissus pseudonarcissus*) și secvențele phytoen-desaturazei (provenită din bacteria *Erwinia uredovora*), acestea premițând generarea lycopenei în endosperm, unde ulterior se sintetizează geranylgeranyl difosfatul, care se transformă ulterior în phytoen (caroten incolor).

Cantitatea de beta-caroten produsă este de 1,6-2,0 $\mu\text{g/g}$. Luând în considerare cel mai mic procent de conversie (12 μg beta-caroten pentru a obține 1 μg de retinol) și aportul zilnic recomandat (400-500 μg retinol pentru copii), ar rezulta un consum zilnic de 2,5 kg de orez auriu (actualmente produs).

În baza conținutului vitaminei A, estimat între 0,16-0,20 mg/100 g orez auriu, biodisponibilitate, factori de conversie, aportul recomandat pentru copii este de 0,3 mg/zi și având în vedere nivelul care ar fi suficient pentru a reduce mortalitatea, morbiditatea și dereglările de vedere, consumul zilnic urmează să fie conform estimării de mai jos (Beyer, Portrykus):

Tabelul 12. Distribuția consumului recomandat de orez auriu

Factorul de conversie	Consumul orezului auriu	În g /zi
în funcție de organism	Disponibilitatea precursorului: 100%	Disponibilitatea precursorului: 50%
X12	540-675	1080-1350
X6	270-337	540-674
X4	180-225	360-450

Conform autorilor, cercetările în ceea ce privește mărirea conținutului pro-vitaminei A în orezul auriu nu se opresc aici. Astfel, se preconizează apariția unei noi varietăți, care va permite eradicarea carențelor și consecințelor acestora în urma consumului aproximativ de 30-224 g/zi.

În plus, orezul auriu a fost modificat și în scopul soluționării unei alte probleme nutriționale majore: carența de fier, care afectează 2,15 miliarde de persoane (Ablkhail și Shawky, 2002). Așadar, pe lângă genele pentru sinteza β -carotenului, orezul auriu conține o genă care mărește gradul de absorbție a fierului din sol și alta care mărește gradul de absorbție a acestuia în organismul uman. Deși modul cel mai eficient de satisfacere a necesarului de vitamină A și de fier al unui organism este reprezentat de consumul unei game largi de alimente, cum sunt carnea roșie slabă și cerealele, pentru aport de fier, și ficatul, ouăle, peștele gras, fructele și legumele de culoare galbenă și portocalie, legumele cu frunze verde închis pentru aportul de β -caroten (Ablkhail și Shawky, 2002), multe persoane

din țările în curs de dezvoltare nu au acces la acestea. Deoarece orezul este un aliment de bază în aceste țări, el poate contribui cu succes la diminuarea carenței de vitamină A și de fier în aceste părți ale lumii, în care alte strategii s-au dovedit ineficiente.

Orezul auriu este încă în faza în care suferă modificări, cercetătorii de la Institutul Internațional de Cercetare a Orezului dorind să-i mărească conținutul de β -caroten.

Un alt aliment modificat genetic, cu posibile beneficii pentru sănătatea locuitorilor din țările în curs de dezvoltare, este un orez care are un randament de obținere cu 30% mai mare decât orezul normal. Ca și orezul auriu, acesta se află încă în stadiu de cercetare.

Nu întotdeauna îmbunătățirile nutriționale obținute folosind tehnicile de inginerie genetică sunt considerate a fi un succes. De exemplu, încercarea de a îmbunătăți conținutul de aminoacizi al soiei a fost o nereușită pe considerente alergice. Soia a fost modificată genetic utilizând gene de la alunele de Brazilia, care conțin concentrații ridicate de aminoacizi cu sulf, iar transferul realizat a inclus și gene ale unei substanțe alergene. Deoarece derivatele din soia sunt utilizate ca ingrediente alimentare, soia cu conținut îmbunătățit de aminoacizi cu sulf a fost desemnată necorespunzătoare pentru utilizare în alimentație (Robinson, 2001).

După cum s-a menționat anterior, unele surse de hrană utilizate în alimentația umană conțin factori antinutritivi (hemaglutinine, saponine, inhibitori tripsinici, glicozide cianogenice, tioglicozide, cumarină, gosipol, carbohidrați flatulenți), care afectează starea de sănătate a consumatorilor. Importanța acestor substanțe variază la nivel mondial în funcție de frecvența prezenței lor în dietă, cantitatea ingerată și sensibilitatea populației la un anumit compus. Ingineria genetică poate interveni pentru a diminua conținutul sau elimina prezența factorilor antinutritivi din alimente. Câteva exemple de utilizare a ingineriei genetice în acest sens sunt prezentate mai jos.

O globulină existentă în orez, rezistentă la acțiunea proteazelor din intestin, produce dermatită atipică, dermatită care afectează în special copiii japonezi. Această globulină este și termostabilă, astfel încât tratarea termică a orezului nu asigură denaturarea ei. Deoarece hidroliza enzimatică a globulinei pentru obținerea de orez hipoalergenic este foarte costisitoare, iar prin mutagenză chimică s-a obținut orez steril, ale cărui boabe încă mai conțineau urme de globulină, s-a apelat la tehnicile de inginerie genetică. Prin inginerie

genetică s-a reușit reducerea semnificativă a globulinei alergene, fără a afecta caracteristicile agrotehnice ale orezului (Robinson, 2001).

Abordări similare pot funcționa pentru a elimina proteinele alergene din alune și boabe de soia. Unele lectine pun probleme de sănătate, astfel încât au fost create varietăți de plante cu conținut redus sau lipsite de aceste substanțe. Pentru soia și fasolea franțuzească s-au găsit, în colecțiile de plante ale cultivatorilor, varietăți care nu posedă gena pentru formarea lectinelor, așadar, pentru acestea va fi posibil să se creeze prin metode clasice varietăți comerciale lipsite de lectine. Pentru alte specii de fasole, care posedă copii multiple ale genelor pentru lectine, nu este posibilă aplicarea procedurii clasice, motiv pentru care inactivarea genelor pentru lectine se poate realiza prin tehnici de inginerie genetică.

Referindu-ne la componenții produselor alimentare, trebuie de menționat că în fiecare zi noi ingerăm un număr mare de bacterii vii. Uneori acestea fac parte din flora saprofită a alimentelor (legume, fructe proaspete, unele mărci de apă îmbuteliată).

Numărul germenilor oportuniști este redus în alimentele de calitate. Pentru alte produse, însă, bacteriile sunt introduse premeditat de om și intervin în transformarea acestora. Ca exemplu servesc mezelurile, brânzeturile și alte produse lactate fermentate. Cel mai mare consum de bacterii vii se referă la iaurturi și la produsele lactate fermentate, căci numărul bacteriilor este de 10^8 bacterii/gram, iar consumul acestor produse depășește 200 g/zi.

În prezent există 4 mari sectoare brevetate ale industriei alimentare, în care se utilizează MMG vii (levuri în calitate de agenți de fermentare): panificația, oenologia, braseria și industria producătoare de etanol.

De asemenea, MMG vii se folosesc în producerea enzimelor, aromelor și auxiliarelor tehnologice pentru industria alimentară. MMG mai sunt utilizate în calitate de microuzine metabolice, iar substanțele obținute sunt purificate și comercializate. De exemplu, chimozina, enzimă utilizată în industria brânzeturilor, este produsă de tulpinile MG de *E. coli*, *Aspergillus niger*, *Kluyvermices lactis*.

MMG vii au rolul de a ameliora procedeele de producere și calitățile organoleptice ale produselor. În majoritatea cazurilor, corpii microbieni sunt separați de produsele finale, cu excepția panificației. Dar având în vedere temperaturile de coacere a pâinii, se presupune că o mare parte din microorganisme sunt distruse.

Potențiale pericole și riscuri pentru sănătate.

1. Modificarea metabolismului MMG poate conduce la efecte nedorite, neașteptate directe sau indirecte pentru organism. În principiu, MMG în sine nu sunt periculoase. Cu toate acestea, supraexpresia acestora poate antrena după sine dereglări la nivelul tractului digestiv.
2. MMG pot fi rezidenți sau tranzitorii care își schimbă statutul funcțional și relația cu flora intestinală.
3. MMG, prin interacțiuni neașteptate cu bacteriile rezidente, pot modifica echilibrul florei intestinale sau pot favoriza instalarea florei patogene.

Un sector aparte în care se utilizează cu succes MMG este industria lactatelor. Acest sector prezintă un interes major pentru medicină din punctul de vedere al folosirii MMG vii cu proprietăți specifice diferite, importante în tratamentul și profilaxia diferitor maladii. Dar acesta rămâne să fie sectorul cu cele mai multe restricții și întrebări fără răspunsuri din cauza securității sanitare care urmează să fie evaluată. Nici unul dintre brevete nu are mențiuni speciale referitoare la sănătate.

PROMOTORI AI

SĂNĂTĂȚII

Unele substanțe conținute de alimente nu reprezintă compuși nutritivi esențiali, dar ele își aduc contribuția la promovarea stării de sănătate. Aceste substanțe cu efect benefic, cunoscute sub denumirea de compuși vegetali bioactivi, sunt

reprezentate de diferite clase de substanțe vegetale: flavonoide, fitoestrogeni, glucozinolați etc. Se fac eforturi atât prin tehnici convenționale, cât și prin tehnici de inginerie genetică pentru a spori conținutul de compuși vegetali bioactivi (de exemplu, mărirea conținutului de glucozinolați din speciile de varză), deși mărirea conținutului lor poate să nu îmbunătățească starea de sănătate.

Alte componente alimentare, cum sunt fibrele, deși nu au valoare nutritivă pentru că nu sunt hidrolizate de enzimele digestive, au efecte benefice asupra funcționării intestinului. Prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică se dorește să se crească proporția de fibre din alimente, deși, ca și alte substanțe, dăunează dacă sunt consumate în exces.

Dezechilibrul între aportul și necesarul de substanțe biologice active, care influențează patologia omului contemporan, poate explica implicareaingin-

eriei genetice în modificarea compoziției alimentelor. Astfel de cercetări pot încuraja consumul de alimente promotoare ale sănătății.

5.2. Industria farmaceutică

Începând cu anii 1980, a început cultivarea MMG și utilizarea lor pentru obținerea moleculelor de interes terapeutic. De exemplu: insulina, hormonul creșterii, vaccinuri (vaccinul contra hepatitei B obținut din tulpina levurică *Saccharomyces cerevisiae*).

Pe parcursul ultimilor 20 ani, în aceste produse au fost introduse noi specii de bacterii. Rolul acestora este de a modifica calitățile gustative și texturale, dar înainte de toate ele sunt folosite pentru a induce efecte benefice pentru sănătatea omului. Ele sunt numite „probiotice” și principalele lor efecte pozitive sunt: reglarea tranzitului intestinal și stimularea sistemului imun.

Astfel, microorganismele modificate genetic (MMG) care au achiziționat noi proprietăți pot fi folosite în scop medical, pentru a conferi produselor proprietățile organoleptice dorite sau pentru a introduce modificări în procesul industrial de producere.

Conform studiilor efectuate, MMG ar putea fi utilizate în viitor nu numai în mod indirect, ci și în mod direct pentru atingerea anumitor scopuri terapeutice și profilactice. Aceasta se referă la MMG care ar putea înlocui un anumit principiu activ (medicament, enzimă) și ar putea fi consumat de om *via* produsele alimentare. De asemenea, e de menționat capacitatea MMG de transportare a unui medicament în porțiunile inferioare ale tractului digestiv (pentru a preîntâmpina degradarea medicamentului sub influența fermenților gastrici) fără a recurge la forme medicamentoase sofisticate.

BACTERII-MEDICAMENTE

Există două domenii principale de utilizare a bacteriilor cu rol de medicamente. Primul domeniu se referă la obținerea vaccinurilor pentru vaccinarea orală, parenterală sau nazală. Astfel, expresia antigenilor virali, tumorali, anticorpilor neutralizanți sau producerea concomitentă a diferitor interleukine și antigeni de către MMG modulează reacții imune necesare profilaxiei sau tratamentului diferitor maladii.

Al doilea domeniu se referă la MMG, care, fiind ingerate, secretă enzime sau mediatori cu rol benefic în tratament sau profilaxie. Exemplul cel mai

marcant la ora actuală este studiul efectuat de echipa lui Steidler: producerea interleukinei 10 de către *Lactococcus lactis* în tractul digestiv.

Experimental s-a demonstrat că acesta reduce inflamația la nivelul tractului digestiv, actualmente fiind testat la pacienții cu boala Crohn (patologie inflamatoare cronică a intestinului).

Tabelul 13. Utilizarea bacteriilor în tratamentul medicamentos

Organismul producător	Molecula produsă	Scopul medical	Referințe
<i>Streptococcus gordonii</i>	Anticorpi H6	Vaginite cu <i>Candida albicans</i>	[57]
<i>Streptococcus gordonii</i>	Anticorpi (similari polizaharidelor capsulare de tip III)	Imunizare pasivă împotriva infecțiilor neonatale cu streptococi din grupa B	[58]
<i>Streptococcus gordonii</i> și <i>Lactococcus casei</i>	Proteina E7	Imunizare contra papilomului virusului uman HPV	[59, 60]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Toxina holerică B	Protecție împotriva holerei	[61]
<i>Bacillus subtilis</i>	Ure B (subunitate a ureazei <i>Helicobacter pylori</i>)	Protecție împotriva <i>Helicobacter pylori</i>	[62]
<i>Bacillus subtilis</i>	Interferon alpha-2 uman	Protecție antivirală	[63, 64]
<i>Bacillus subtilis</i>	Fragment C al toxinei tetanosului	Protecție împotriva <i>Clostridium tetani</i>	[65, 66]

REMEDII MEDICAMENTOASE ȘI VACCINURI

În prezent, cercetările privind utilizarea biotehnologiilor pentru producerea medicamentelor cuprind diverse domenii printre care: cancerul, obezitatea, bolile genetice rare. Pentru ultimele, biotehnologiile reprezintă singura cale de vindecare. Însă toate aceste cercetări vor dura cel puțin câteva zeci de ani.

Ingenieria genetică va permite producerea unor noi antibiotice, fiindcă antibioticele actuale acționează doar asupra unor reacții chimice proprii microbilor. Identificarea totalității reacțiilor și studierea mecanismelor de apărare a insectelor și plantelor împotriva infecțiilor vor deschide o nouă cale în era preparatelor antimicrobiene.

O altă viitoare aplicare a geneticii este farmacogenetica. Ea urmează să optimizeze tratamentul în general. Astfel, datorită testelor genetice, va fi posibilă alegerea tratamentului individual, adaptat caracteristicilor organismului respectiv.

În prezent, biotehnologiile sunt utilizate pentru producerea medicamentelor care nu pot fi obținute pe cale chimică din cauza imposibilității sintezei sau costului prea ridicat. Actualmente mai mult de 100 de medicamente și vaccinuri sunt obținute prin inginerie genetică.

Prima aplicare a biotehnologiilor a fost producerea vaccinurilor, serurilor și antibioticelor. Astăzi, biotehnologiile permit înlocuirea produselor extrase din organe umane și animale cu remedii produse de către bacterii (începând cu 1982, diabetul zaharat este tratat cu ajutorul insulinei produse de bacterii, înlocuind astfel extractul pancreasului de porc).

Medicina moderna studiază în continuare posibilitățile de sinteză a produselor farmaceutice mai efective pentru prevenirea și tratarea bolilor. Ca exemplu poate servi implicarea ingineriei genetice în obținerea vaccinurilor comestibile, plantelor producătoare de anticorpi și proteine umane.

Ingenieria genetică face posibilă și fabricarea moleculelor complexe, imposibil de extras prin metode industriale din cauza concentrației infime a acestora. Acesta e cazul eritropoetinei (EPO), hormon care permite tratamentul diferitor forme de anemie, de asemenea interferonului utilizat în tratamentul cancerului și câțiva hormoni.

Producerea proteinelor medicamentoase prin ingineria genetică decurge prin transferul genei corespunzătoare într-un organism ușor de cultivat (microorganism, plantă). Această operațiune se numește „clonaj al genei” și creează un OMG. După aceasta, purificarea proteinei se face cu ajutorul metodelor industriale sofisticate. Costul acestui tip de producere este mai ridicat decât la producerea chimică.

Posibilitățile contemporane permit înlocuirea, în anumite cazuri, a bacteriilor și levurilor prin utilizarea plantelor MG. Extracția moleculelor din plante este mai facilă decât din bacterii și levuri și este mai puțin costisitoare.

Plantele MG au deschis o nouă cale de cercetare a vaccinurilor, și anume a vaccinurilor comestibile. Sistemele de producere a proteinelor „de interes” farmaceutic cu ajutorul plantelor MG prezintă următoarele caracteristici și avantaje:

- celulele vegetale sunt celule eucariote (ca și celulele umane), ele dispunând de un sistem ce permite în multe cazuri de a produce proteine complexe cu proprietăți terapeutice echivalente proteinelor umane. De asemenea, transgeneza vegetala permite fabricarea vaccinurilor imposibil de fabricat prin metode tradiționale,
- nivelul actual al biotehnologiilor permite de a depista precis țesuturile care exprimă proteina „de interes”, astfel devenind posibilă stocarea eficientă și extragerea mai ușoară a acestora.

Vaccinurile clasice sunt culturi microbiene distruse sau cu virulență atenuată, sau fragmente de antigene, utilizate în profilaxia unor boli infecțioase. Avantajele vaccinurilor comestibile (exprimate în plante) ar fi eliminarea necesității de purificare și eliminarea căii injectabile de administrare. Experiențele au demonstrat că în urma administrării vaccinurilor este indus răspunsul imun (Tacket et al., 1998). În plus, acești antigeni formează un răspuns imun potrivit organismului-gazdă. Studiile au fost efectuate pe: porumb, tutun, roșii, soia, cartof, salată, spanac, mazăre (Langridge, 2000).

Primul studiu care a demonstrat că plantele pot exprima antigenii a avut loc în 1990 (Curtiss, Cardineau). În acest studiu, tutunul a fost modificat genetic pentru a exprima antigenul de suprafață al bacteriei dentare, *Streptococcus mutans*. Experiența a fost efectuată pe șoareci, rezultatul fiind pozitiv, adică s-au format anticorpi împotriva acestei bacterii. Pentru prima dată, eficacitatea vaccinurilor comestibile a fost raportată în 1995 (Arntzen), iar prima relatare despre vaccinurile comestibile umane a fost făcută în 1998. Astfel, s-a ajuns la concluzia că vaccinurile comestibile supraviețuiesc în urma digestiei și efectiv stimulează răspunsul imun.

Începând din acel moment, multe alte vaccinuri au fost exprimate în diferite plante. De exemplu, vaccinuri contra: rabiei, holerei, diareei călătorului, cariei dentare, cancerului de colon, infecțiilor pulmonare, hepatitei B, *Helicobacter pylori* (cauza ulcerului), citomegalovirusului, virusului Norwalk, ș. a. (Hood, Jilka 1999, Walmsley, Arntzen, 2000).

În curs de dezvoltare este vaccinul comestibil împotriva hepatitei B cultivat în banană. Eficacitatea acestuia a fost demonstrată deja la șoareci. De asemenea, se efectuează cercetări în privința porumbului MG pentru prevenirea și trata-

mentul SIDA. În mai 2001, savanții Universității „Thomas Jefferson” au anunțat despre cercetările în privința spanacului MG, cu scopul de a obține expresia proteinei HIV-supresoare, cu speranța ca aceasta să fie o cale spre un vaccin eficient împotriva SIDA. Cercetătorii au introdus gena care exprimă proteina HIV-supresoare într-un virus vegetal, obținând astfel inserția materialului genetic în spanac. Ulterior, planta începe să producă proteina respectivă.

O altă echipă de cercetatori a Universității din California au obținut cartofi transgenici purtători de vaccin împotriva holerei. Este vorba de toxina holerica B, proteină inofensivă care declanșează răspuns imun la șoareci și la oameni.

La 25 ianuarie 2007, o echipă a Universității Centrale din Florida a anunțat despre producerea a unei antigen-proteine extrasă din cloroplastii tutunului MG, care poate fi utilizat în producția vaccinului împotriva amebezei (boală parazitară care afectează intestinul gros, anual îmbolnăvindu-se 50 mln și provocând moartea a 100 000 persoane).

Vaccinurile obținute prin ingineria genetică pot fi mai ieftine decât cele produse în laborator. În al doilea rând, datorită acestei metode, este îmbunătățită tehnica securității, deoarece producerea clasică implică un înalt risc de infectare a personalului implicat. De asemenea, un alt avantaj este că pot fi conservate la temperatura mediului ambiant în ambalaj natural – fructul (vaccinurile comestibile).

Ca o varietate a conceptului utilizării vaccinurilor comestibile, implicate în dezvoltarea imunității, cercetătorii experimentează calea folosirii alimentelor MG pentru supresarea imunității (cazul bolilor autoimune, când organismul produce anticorpi împotriva țesuturilor proprii: psoriasis, lupus eritematos, artrita reumatoidă ș. a.). În prezent, se lucrează la obținerea vaccinului comestibil împotriva diabetului, planta implicată fiind cartoful ce conține decarboxilaza acidului glutamic – enzima implicată în procesele autoimune (Arakawa et al., 1998).

ANTICORPI ȘI PROTEINE TERAPEUTICE

Pe lângă producerea vaccinurilor, cercetătorii lucrează și la crearea plantelor producătoare de anticorpi. Deocamdată toate descoperirile rămân la faza de laborator. Se consideră că acești anticorpi vor fi utilizați mai pe larg pentru diagnosticul diferitor boli la oameni și animale.

Succesul în prevenirea bolilor prin intermediul plantelor producătoare de anticorpi a fost raportat pentru prima dată în 1998. În studiul respectiv au fost descrise primele experiențe clinice la om, în care anticorpii obținuți de la plantă au fost aplicați pe dinți, în loc să fie consumați ca vaccin comestibil.

Acest tratament previne colonizarea cu *Streptococcus mutans*, demonstrându-se astfel posibilitatea de a preveni patologiile dentare. De asemenea, în fază de cercetare, sunt studiile legate de tratamentul cancerului. În 2000, Stoger et al. a anunțat despre expresia anticorpului împotriva antigenului carcinoembrionic în grâu și orez.

Despre crearea plantelor MG, care produc anticorpi pentru diagnostic s-a raportat în Japonia în 1998 (Tsuda et al.). Astfel, a fost obținut un soi de tutun MG care exprimă antigenul HB core al hepatitei B, acesta fiind folosit pentru determinarea contaminării cu virusul hepatitei B. Estimările arată că conținutul unei frunze de tutun MG poate fi utilizat pentru testarea a 64 000 - 102 000 indivizi (în funcție de concentrația antigenilor în frunze).

Lista proteinelor umane care pot fi obținute cu ajutorul plantelor MG este în permanentă creștere, datorită cererii înalte pentru uz terapeutic și diagnostic. De exemplu: enkefalinele, δ -interferonul, albumina, hemoglobina, eritropoetina, enzima de conversie a angiotenzinei-1 (Giddings et al., 2000).

Hemoglobina este o moleculă-cheie a respirației, întrucât asigură transportul oxigenului și al bioxidului de carbon în sânge. De mai multe decenii, savanții sunt în căutarea unui substituent sangvin, care ar putea fi stocat și transportat cu ușurință și care nu ar pune problema compatibilității după grupele de sânge și a riscului infecțios. Acest substituent ar putea fi folosit în cazuri de urgență în situații de hemoragii masive. În prezent se evaluează posibilitatea producerii tutunului transgenic, care va produce molecula hemoglobinei umane. Hemoglobina este sintetizată datorită activității a 2 gene. Aceste 2 gene au fost transferate în tutun, ceea ce a permis sinteza acesteia în celulele plantei. În continuare se efectuează diverse studii clinice, care ar permite o ulterioară aplicare în practică.

Colagenul este principala proteină a pielii omului. Este aplicat în calitate de cicatrizant, acoperire a implanturilor, pansament în traumatisme, tratamentul cicatricelor și ridurilor ș.a. Colagenul utilizat actual este preluat de la bovine. Situația dată creează cerere pentru colagenul uman sintetizat de plantele transgenice, fiindcă astfel s-ar elimina reacțiile imune și posibilitatea infectării cu diverși agenți patogeni specifici animalelor. Două echipe de cercetători francezi au reușit producerea colagenului uman în tutunul MG. Cercetările continuă.

Lipaza gastrică este o proteină utilizată în tratamentul insuficienței funcției exocrine a pancreasului. În lipsa lipazei gastrice devine imposibilă digestia lipidelor. Această problemă afectează îndeosebi pacienții cu mucoviscidoză sau cu patologii ale pancreasului.

Mucoviscidoza este o maladie ereditară frecventă în Europa, constituind 1/2500 noi-născuți. Lipaza gastrică este indispensabilă acestor bolnavi în calitate de tratament de susținere și pentru a încetini evoluția patologiei. Tratamentul actual se bazează pe administrarea extractului pancreatic de porc el, însă, rămânând ineficient pentru 15% de pacienți.

În cadrul unui laborator din Franța se fac cercetări în privința unei lipaze gastrice produse din porumb MG. Astfel, gena care codifică această lipază este transferată mai întâi în tutun (planta de testare), apoi în rapiță, acestea fiind mai eficiente în ceea ce privește producerea moleculelor farmaceutice. Lipaza gastrică obținută din tutun reprezintă 0,5 - 1% de materie uscată de frunze, 1 kg/ha, ceea ce permite de a trata câteva zeci de bolnavi pe an. În 2005, în Franța s-au cultivat 20 ha porumb MG producător de lipază gastrică.

Societatea „Meristem Therapeutics” a fabricat un soi de porumb transgenic, care produce o lipaza gastrică de câine destinată îmbunătățirii stării tractului digestiv al copiilor bolnavi de mucoviscidoză. Aceasta a devenit o alternativă eficace de producere a acestei proteine. Până la momentul dat, lipaza gastrică era produsă cu ajutorul levurilor prin transgeneză, procesul acesta ocupă câteva săptămâni.

Avantajul acestei metode este următorul: toate proteinele obținute cu ajutorul microorganismelor necesită diferite modificări chimice pentru a deveni active. De exemplu, glicozilarea, care este realizată în laborator și implică pierderi atât de cost, cât și de calitate. Pe când plantele sunt capabile să realizeze aceasta (de asemenea și alte modificări posttraducționale) astfel încât să se obțină substanța activă gata formată.

Dezavantajul principal este legat de riscul de diseminare. Producția unei substanțe farmaceutice în câmp deschis este echivalentă cu deschiderea unei farmacii „pe natură”. Astfel, poluarea genetică având loc atât pe orizontală (transfer direct al materialului genetic între 2 organisme fără încrucișare, de exemplu între plante și microorganismele solului), cât și pe verticală (polenizarea și încrucișarea între varietăți).

PRODUCEREA PROTEINELOR UMANE

Primul șoarece transgenic a fost obținut în 1981 (Gordon, Ruddle, 1981). El a fost inginerizat pentru ai include gena hormonului creșterii umane. Spre deosebire de semenii obișnuiți, șoarecele transgen era mult mai mare, iar nivelul hormonului de creștere în sânge era de câteva sute de ori mai mare. Ulterior, câteva rase de șoareci MG au fost create pentru producerea proteinelor umane

destinate studiilor în domeniul infecțiilor, cancerului, inflamațiilor (Yang X-D et al., 1999, Russel et al., 2000). În prezent, proteinele umane sunt produse în oi, porci și capre, obiectivul general fiind proteinele implicate în patologii genetice.

Alfa-1-antitripsina (ATT) este enzima cu funcție de inhibare a elastazei. Multe boli ale aparatului respirator, îndeosebi fibroza cistică, se datorează dezechilibrului dintre acestea două. Deficiența severă a ATT (emfizemul ereditar) afectează aproximativ 200 000 oameni în SUA și în Europa. Pentru a asigura pacienților tratamentul, sunt folosite animale MG pentru a produce această proteină.

Modificarea genetică a animalelor este, de asemenea, folosită pentru obținerea **vaccinului antimalaric**. În 1998, cercetătorii de la Genzyme Transgenic, Marea Britanie, în colaborare cu savanții de la American National Institute of Allergy and Infectious Diseases, au raportat producerea antigenului MSP-1 în laptele șoarecilor MG. MSP-1 declanșează producerea de anticorpi împotriva *Plasmodium falciparum*.

Lizozimul este o proteină antimicrobiană care se conține în laptele uman. În prezent, se fac cercetări în privința aplicării ingineriei genetice pentru sporirea producției de lizozim în laptele de vaci, util pentru copiii care sunt hrăniți în bază de lapte de vaci, ridicând astfel nivelul protecției organismului uman.

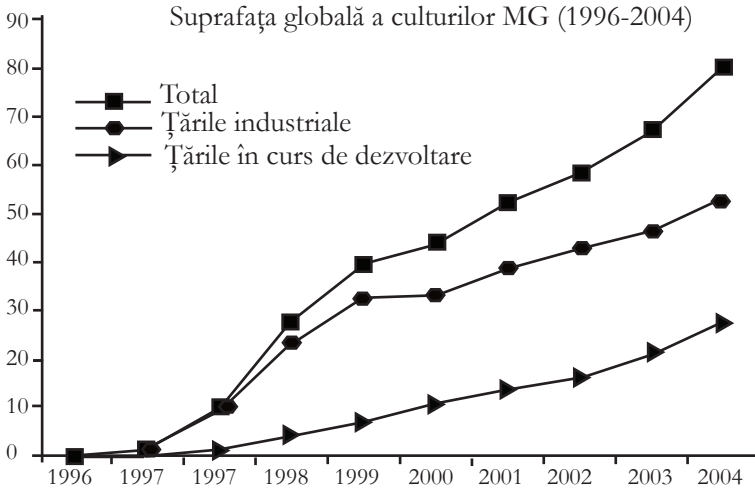
Insulina umană este, actualmente, produsă prin transgeneză cu ajutorul bacteriilor, pe calea fermentării (din 1981). La ieșire din microorganisme ea nu este funcțională și urmează să fie supusă anumitor modificări *in vitro*, înainte de a fi administrată persoanelor cu diabet zaharat. Întreprinderea argentiniană Biosidus a anunțat că 4 vaci transgenice născute la ei posedă în patrimoniul lor genetic gena insulinei umane, prin urmare, produc lapte care conține insulină. Cercetătorii de la Biosidus speră ca în următorii 3 ani să obțină un taur MG cu același patrimoniu genetic pentru a putea perpetua rasa.

XENOTRANSPLANTUL

O altă arie de cercetări în privința animalelor MG este producerea țesuturilor și organelor pentru utilizarea la oameni. Majoritatea cercetărilor se fac pe porci, din cauza similitudinii maxime cu omul. Pentru prima dată despre clonarea porcilor s-a anunțat în 2000, de către „PPL Therapeutics”. Sarcina de bază, specifică acestui domeniu, este de a crea țesuturi lipsite de *1-galactozil transferază*, proteina legată de rejecția țesuturilor umane (problema de bază a transplantologiei).

ÎNCHEIERE

Conform raportului prezentat de către „International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications”, în 2006 suprafața acoperită de către plante MG a constituit 102 mln. ha, cu 13% mai mult decât în anul precedent.



Clive James; 2004

Figura 5. Suprafața globală a culturilor MG (1996-2004)

În 2006, țările principale în privința cultivării plantelor MG au fost: SUA, Argentina, Brazilia, Canada, India și China, din care suprafața utilizată de către SUA a constituit 53%. În Europa, țara cu cea mai mare suprafață, acoperită de culturile MG este Spania, cu 100 000 ha, urmată de Portugalia, Franța, Germania, Republica Cehă și Slovacia.

Deși comunitatea științifică este, în mod obișnuit, de acord cu faptul că scăparea genelor de sub control („evadarea” genelor) este un eveniment probabil, impactul acestui fenomen este discutabil. O teamă majoră este posibilitatea ca genele nou - introduse să confere plantelor un avantaj selectiv care le va permite să intre în competiție și să elimine vegetația naturală.

Timp de mai mulți ani societatea civilă din mai multe țări a luptat pentru protecția mediului și a sănătății populației. Principiul de precauție a jucat un rol considerabil în formarea noii abordări pe întreg globul pământesc privitor

la rezolvarea problemelor de mediu și asigurarea sănătății publice. Se consideră că expresia culminantă a principiului de precauție la nivel internațional a constituit-o Declarația de la Rio din 1992 la Conferința ONU pentru Mediu și Dezvoltare (Agenda 21).

Actualmente, populația planetei se confruntă cu un pericol fără precedent pentru sănătatea umană și pentru existența unui mediu durabil. Totodată, există oportunități pentru schimbarea fundamentală a activităților care sunt realizate, principiul de precauție rămânând unul cheie.

Printre riscurile ce țin de prezența organismele MG, se evidențiază transmiterea genetică pe orizontală, siguranța generațiilor multitransgenice, a vaccinurilor MG, utilizarea noilor nanobiotehnologii. Studiile științifice recente arată, că utilizarea metodelor actuale ar putea să nu asigure identificarea materiei MG în alimente. Astfel, rămânem cu un număr mare de întrebări fără de răspuns.

„Când o anumită activitate crește pericol pentru sănătatea publică or pentru mediul ambiant, măsurile de precauție ar trebui să fie întreprinse, chiar dacă unele relații de cost-efect nu sunt științific totalmente stabilite.”

Wingspread Statement on the Precautionary Principle, ianuarie 1998.



BIBLIOGRAFIE

1. OGM-food & bio pollution certification, Pilot project I/02/B/F/PP-120211.
2. H. Maelor Davies, *Engineering new oilseed crops from rapeseed*, Purdue University, 1996.
3. Ph. Desmarescaux, *Situation et perspectives de développement des productions agricoles à usage non-alimentaire*, p. 25.
4. Mougou C., Chaplan V., Gaillardon P., Sohier L., Mercier R., Sigoillot J.-C., Asther M., *Le traitement biologique des sols pollués par des composés organiques - l'intérêt des champignons filamenteux*, in *Le Courrier de l'environnement* nr. 28, août 1996.
5. *Gestion des déchets organiques et des boues: un choix local*, in *Dossier Science&Decision*, février 2003.
6. F. Guillaume, *Rapport d'information déposé par la délégation de l'Assemblée nationale pour l'Union européenne sur les biocarburants dans l'Union Européenne*, France, Assemblée nationale. Délégation pour l'Union européenne. pp.19-32.
7. Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. and Conejero, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: 245-264.
8. Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A., 1999. *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
9. Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. and Van Loon, L. C. 1980. *Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV*. *J. Gen. Virol.* 47: 79-87.
10. Epple, P., Apel, K. and Bohlmann, H. 1995. *An Arabidopsis thaliana thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins*. *Plant Physiol.* 109: 813-820.
11. Garsna-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A. and Moreno, M. 1995. *The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants*. *Trends Microbiol.* 3: 72-74.
12. Green, T. R. and Ryan, C. A. 1972. *Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects*. *Science* 175: 776-777.

13. Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M. and Rothstein, S. 1987. *Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7542-7546.
14. Melchers, L. S., Apotheker-de Groot, M., Van der Knaap, J. A., Pontstein, A. S., Sela-Buurlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B. J. C., Van den Elzen, P. J. M. and Linthorst, H. J. M. 1994. *A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity*. Plant J. 5: 469-480.
15. Metraux, J.-P., Streit, L. and Staub, Th. 1988. *A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33: 1-9.
16. Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T. and Sano, H. 2000. *Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins*. Plant Mol. Biol. 42: 479-488.
17. Somssich, I. E., Schmelzer, E., Bollmann, J. and Hahlbrock, K. 1986. *Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding „pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2427-2430.
18. Terras, F. R. G., Schoofs, H., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. 1992. *Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds*. J. Biol. Chem. 267: 15301-15309.
19. Van Loon, L. C. 1982. *Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection*. In: *Active Defense Mechanisms in Plants* (R.K.S. Wood, ed.), pp. 247-273, Plenum Press, New York, USA.
20. Vera, P. and Conejero, V. 1988. *Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase*. Plant Physiol. 87: 58-63.
21. Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C. H., Schmelzer, E., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Smedegaard-Petersen, V. and Thordal-Christensen, H. 1998. *An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus*. Plant Mol. Biol. 36: 101-112.
22. Zhang, Z., Collinge, D. B. and Thordal-Christensen, H. 1995. *Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus*. Plant J. 8: 139-145. Nordlee, J. S., Taylor, S.,

- Townsend, J., Thomas, L., Bush, R. 1996. *Identification of a brazil- nut allergen in transgenic soybeans*. New England J. Med. 334:688-692.
23. S. L. Franck-Oberspach, B. Keller. *Consequences of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicology and allergenicity*. Plant breeding 116, 1-17 (1997).
24. Smith J. M. *Inhaled GM maize pollen may cause disease*.
25. Pryme I. F., Seralini G., Velot C. *Statement on the potential allergenicity of the Bt toxin, Cry1Ac*.
26. Glare, T.R., O Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*.
27. Pusztai, A., Bardocz, S. *Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications*.
28. Pusztai A., *Plant lectins*. Cambridge University Press 1991.
29. Tudor A., Popescu A. *Alimentația în funcție de grupa sanguină*. Ediție specială, 25 iulie 2007.
30. More D. *Oral allergy syndrome*.
31. Hoffmann-Sommergruber K. *Pathogenesis-related proteins identified as allergens*. Biochem Soc Trans. 2002 nov; 30 (Pt 6): 930-5.
32. Vieths S., Scherer S., Ballmer-Weber B. *Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen*. Ann NY Acad Sci. 2002 may; 964: 47-68.
33. *Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study*. World Health Organization 2005.
34. Dr. T. Traavik: *GMO risks and hazards: Absence of evidence is not evidence of absence of risk*. (Third World Resurgence No. 104/105, April/may 1999).
35. FDA DOCKET N. 92N-0139, statement of policy: foods derived from new plant variety.
36. Pusztai, *Genetically Modified Foods: are they a risk to human/animal health?*
37. *Safety of genetically engineered crops*. VIB publication. Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology. 2001.
38. „The nucleolus”, Schwarzacher Hget al., Anat Embbryol 1993; 188: 515-36.

39. *Characterization of commercial GMO inserts: a source of useful material to study genome fluidity.* Collonnier et al., 7th International Congress of Plant Molecular Biology, 2003.
40. *Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation.* MAFF Report CS0116.
41. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. Netherwood T. Et al. *Nat Biotechnol.* 2004 feb; 22:920-9.
42. *The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells.* Traavik et al., *European Food Research and Technology.* Oct 2005.
43. Chowdhury et al., *Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11.* *Journal of Animal Science* 2003. 81; 2546-2551.
44. Vecchio L. Et al., *Transcription and metabolism in testis of mice fed on GM soybean.* 46 e symposium d'histochimie, sept. 2004. Prague.
45. L. Ceballos, E. Meunier. *Santé et PGM: des doutes renforcés.* Dossier Inf, OGM Nr. 76-juin 2006.
46. E. Meunier. *Produits d'animaux nourris aux OGM: innocuité pour le consommateur.* Dossier Inf. OGM, n. 53, 2004.
47. Doerfler W. et al., *Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA.* *Proceedings of National Academy of Sciences.* 1997. n. 94, pp.961-966.
48. Einspanier R. Et al., *The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material.* *European Food Research Technology.* 2001. 212. pp 129-134.
49. Chowdhury et al., *Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed with genetically modified corn Bt11.* *Journal of Animal Science,* 2003, n. 81, pp. 2546-2551.
50. Rackis, Joseph J. et al. „The USDA trypsin inhibitor study. I. Background, objectives and procedural details”, in *Qualification of plant foods in human nutrition*, vol. 35, 1985.
51. James, J. M., Sixbey, J. P., Helm, R. M., Bannon, G. A. and Burks, A. W. 1997. *Wheat alpha-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization,* *Journal of allergy and clinical immunology* 99: 239-244.

52. Heinemann, J. A. and Traavik, T. 2004. *Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants* Nat. Biotechnol.
53. *EFSA report on antibiotic resistance markers*, 22 April, 2004.
54. *Safety of genetically engineered crops*. Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology. March 2001.
55. US Natl. Acad. Sci. Inst. of Medicine, January 9, 2001. Beyer P. *Tables on provitamin A amount*, Forum US AgBioView, 2001.
56. FAO/WHO Expert Consultation (1998) Requirement of Vitamin A, Iron, Folate, and Vitamin B12. Food and Nutrition Series no.23, FAO, Rome The latest report to consider requirement for vitamin A.
57. Beninati C., Oggioni M., Boccanera M., Spinosa M. R., Maggi T., Conti S., Magliani W., De Bernardis F., Teti G., Cassone A., Pozzi G., Polonelli L (2000). *Therapy of mucosal candidiasis by expression of an antiidiotype in human commensal bacteria*. Nat Biotechnol 18(10):1060-4
58. Beninati C., Oggioni M., Mancuso G., Midiri A., Polonelli L., Pozzi G., Teti G., (2001) *Anti-idiotypic vaccination against group B streptococci*. Int rev Immunol 20(2): 263-73.
59. Di Fabio S., Medaglini D., Rush C.M., Corrias F., Panzini G.L., Pace M., Verani P., Pozzi G., Titti F. (1998). *Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with Str.gordonii expressing HIV-1 and HPV 16 antigens*. Vaccine 16(5): 485-92.
60. Medaglini D., Oggioni M. R., Pozzi G., (1998). *Vaginal immunization with recombinant gram-positive bacteria*. Am J Reprod Immunol 39(3): 19-208.
61. Slos P., Dutot P., Reymund J., Kleinpeter P., Prozzi D., Kieni M.P., Delcour J., Mercenier A., Hols P. (1998). *Production of cholera toxin B subunit in Lactobacillus*. FEMS Microbiol Lett 169(1): 29-36.
62. Urdaci M. C., Pinchuk I. V., Sorokulova I. B., Megraud F. (2003). *Use of bacillus subtilis strain CU1 as a vaccine delivery system for mucosal immunization against Helicobacter pylori infection in mice*. FEMS Congress, Bacllus 2003 satellite symposium, Ljubljana, Slovenia.
63. Sorokulova I. B., (1998). *The safety and reactogenity of the new probiotic subalin for volunteers*. Microbiol Z. 60(1): 43-6.
64. Beliavskaia V. A., Kashperova T. A., Bondarenko V. M., Ilchev A. A., Sorokulova I. B., Malik N. I., (2001). *Experimental evaluation of the biological safety of gene-engineered bacteria using a model strain Bacillus subtilis*

- interferon-producing strain*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2001, 2: 16-20.
65. Duc le H., Hong H.A., Fairweather N., Ricca E., Cutting S.M. (2003). *Bacterial spores as vaccine vehicles*. Infect Immun. 71: 2810-8.
66. Mauriello E. M., Duc le H., Istatico R., Cangianco G., Hong H. A., Felice M. D., Ricca E., Cutting S.M.(2004). *Display of heterologous antigens on the Bacillus subtilis spore coat using CotC as fusion partner*. Vaccine. 22: 1177-87.
67. Affsa, *OGM et alimentation: peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ?*
68. *Contre information sur les OGM médicamenteux*. Rapport du Dr. C. Velot, 18 mars, 2005.
69. A. Webster, N. Brown, B. Rappert, P. Martin, R. Frost. *Genetics: an inventory of new and potential development in human genetics and their possible uses*. European Parliament. Directorate General for Research. September 2001. pp 23-27.
70. *Rapport sur l'état des médicaments orphelins*. European agency for evaluation of medicinal products. 8 avril 2002.
71. J. Paugh, J. C. Lafrance. *The US biotechnology industry*. US Department of commerce. Office of technology policy. July 1997.
72. R. Kirschstein, L. R. Skirboll. *Stem cells: scientific progress and future research directions*. Report prepared by the National Institutes of health. June 2001.
73. J-H. Trouvin, K. Ho. *Protéines médicaments. De la transgenèse animale à la biothérapie chez l'homme*. N. Le Douarin éditeur. Rapports sur la science et la technologie nr.14. Académie des Sciences. Février 2003. p. 120.
74. *Contre information sur les OGM médicamenteux*. Rapport du Dr. C. Velot, 18 mars, 2005.
75. A. Nicolau. *Alimente modificate genetic în scopuri nutriționale*.
76. Zavaleta et al. *Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea*. Pediatr Gastroenterol Nutr.