

Opinião Técnica

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e em conformidade com o artigo 14, n.º XIX, da Lei 11.105/05 e artigo 5.º, parágrafo XIX do Decreto 5.591/05, comunica que a Reunião Ordinária 161, realizada em 18 de abril de 2013, a CTNBio apreciou e ratificou a posição da presidência sobre o seguinte tema:

opinião considerada

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, em resposta à demanda do Ministério das Relações Exteriores, nomeou uma comissão composta por quatro ilustres pesquisadores que avaliaram o trabalho de Seralini e seus colaboradores em publicação prévia na revista Food and Chemical Toxicology, disponível no site [http://ac.els-cdn.com/S0278691512005637/1-s2.0-S0278691512005637-main.pdf?_tid=bdde0922-2296-11e2-ada7-00000aab0f6c & acdnat=1351604340_c8d8f6b6fbeeec91e0ef4b1ca2444c8f](http://ac.els-cdn.com/S0278691512005637/1-s2.0-S0278691512005637-main.pdf?_tid=bdde0922-2296-11e2-ada7-00000aab0f6c&acdnat=1351604340_c8d8f6b6fbeeec91e0ef4b1ca2444c8f). O resultado desta avaliação está abaixo. Este relatório técnico foi emitido pelo Presidente da CTNBio em 24 de outubro de 2012 e confirmado na 161ª Reunião Ordinária da Comissão.

Ofício nº 964 /12- CTNBio

Brasília, 24 de outubro de 2012.

Ao Senhor
Orlando Leite Ribeiro
Chefe da Divisão de Agricultura e Produtos de Base
Ministério das Relações Exteriores

Assunto: Mensagem eletrônica Nr. 01046

Prezado Senhor,

Em resposta a mensagem eletrônica Nº 01046, enviada em 21 de outubro corrente ano a Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) indicou em caráter de urgência uma comissão extraordinária para exame do artigo científico enviado anexo a referida mensagem. Foram nomeados dois relatores membros da CTNBio das áreas de saúde humana e animal e dois consultores *Ad Hoc* externos, especialistas no temas em análise.

A síntese das análises destes especialistas segue anexo e representa a resposta da Presidência da CTNBio à demanda enviada na mensagem acima citada. Diante de novos fatos científicos ou documentais sobre esse assunto, outro exame poderá ser necessário.

Atenciosamente,



Dr. Flávio Finardi Filho

Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

AValiação DE PUBLICAÇÃO DE TRABALHO EXPERIMENTAL EM CARÁTER DE URGÊNCIA

Documento

Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendômois JS. Longtermtoxicityof a Roundupherbicideand a Roundup-tolerantgeneticallymodifiedmaize. FoodChemToxicol. 2012 Sep 11. pii: S0278-6915(12)00563-7. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.005

Pareceristas

Prof. Dr. José Fernando Garcia - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, SP

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Profa. Dra. Maria Lucia ZaidanDagli - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Profa. Dra. NanceBeyer Nardi - Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS

Resumo

Numa avaliação geral, o presente trabalho representa forte empenho em avaliar as consequências da alimentação com plantas geneticamente modificadas (GM), expostas ou não ao herbicida ao qual são resistentes, bem como do herbicida em si, em ratos após longo período de tratamento. Os resultados gerados poderiam trazer valiosas informações sobre a questão levantada pelos autores, porém o trabalho falha totalmente em chegar aos objetivos por diversas razões, das quais destacamos as principais:

(1) A linhagem de ratos foi mal selecionada para o estudo, pois sabe-se que ratos Sprague-Dawley desenvolvem tumores espontaneamente em frequência maior que outras linhagens (Keenam et al., 1979). A escolha de outra linhagem teria conferido maior consistência e confiabilidade ao conjunto de resultados do trabalho.

(2) Os resultados são descritos e ilustrados de forma não convencional na literatura científica, conduzindo a uma relação entre a alimentação com plantas GM e maior mortalidade ou surgimento de tumores, sem apresentar dados numéricos na maioria das análises e avaliações estatísticas. Uma pesquisa do documento mostra que a expressão “statistic” aparece apenas duas vezes: no item 2.6, “Statisticalanalysis” na seção Materiais e Métodos; e no item 3.3 (Resultados, análises bioquímicas), na frase “For biochemicalmeasurements in rats, statisticalanalysis”. Isto confirma que os dados apresentados quanto aos parâmetros bioquímicos foram os únicos resultados submetidos à análise estatística, ainda assim de forma pouco clara.

(3) Outros pontos recomendam precaução com relação ao estudo, que incluem: ausência de definição da linhagem de milho controle, descrita apenas como “closestisogenicmaize” (Tabela 1); identificação de resultados similares com milho GM tratado ou não com o herbicida, e com o herbicida em si, sem relação dose-efeito; reduzido número de animais por grupo (10 machos e 10 fêmeas), sobretudo ao considerar as diferenças sexo-específicas; para vários dos resultados, os grupos “tratados” (n=90) são comparados com os “controles” (n=10) para cada sexo, enquanto grupos controle e experimental devem ter amostra de tamanho similar.

Finalmente, a avaliação do artigo indica que pelos resultados apresentados não é possível estabelecer qualquer conclusão sobre o efeito a longo prazo da alimentação com milho GM, tratado ou não com o respectivo herbicida, em ratos. Para tal, os dados deveriam ser descritos de modo mais preciso e submetidos a uma avaliação estatística consistente.

Portanto, o presente parecer aponta as principais limitações técnicas da publicação que invalidam as conclusões apresentadas pelos autores.

1 Introdução

O presente documento consiste em uma avaliação crítica da publicação científica “Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendômois JS. Longtermtoxicityof a Roundupherbicideand a Roundup-tolerantgeneticallymodifiedmaize. FoodChemToxicol. 2012 Sep 11. pii: S0278-6915(12)00563-7. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.005”. A avaliação foi realizada seguindo normas consagradas para a revisão de artigos científicos e levando-se em consideração exclusivamente as informações divulgadas no artigo.

O objetivo principal do estudo foi a investigação do efeito a longo prazo da alimentação com milho geneticamente modificado (GM), tratado ou não com o respectivo herbicida, além do efeito do herbicida em si, em ratos. Uma análise do contexto em que esta publicação está inserida mostra que o tema é de alta relevância, por se tratar de uma área de pesquisa onde vários outros grupos têm realizado estudos com objetivos similares. Recentemente, Domingo e GinéBordonaba (2011) e Snell et al. (2012) publicaram revisões reunindo diversos estudos que avaliaram a segurança da alimentação com plantas GM.

Na revisão de Domingo e GinéBordonaba (2011), são salientados os principais resultados de 27 estudos. Destes, apenas 4 indicam possíveis alterações nos animais alimentados com plantas GM, em comparação aos controles. Dois destes estudos são do grupo de Séralini, e outros dois do grupo da pesquisadora italiana Manuela Malatesta. A revisão de Snell et al. (2012), mais estrita por considerar apenas experimentos de longo termo, salienta entre 24 estudos apenas 4 com indicação de efeitos prejudiciais da alimentação com plantas GM. Todos são do grupo de Malatesta (co-autora do trabalho aqui avaliado). Pode-se observar assim uma tendência de grupos restritos, entre os quais enquadra-se o de Séralini, na obtenção de resultados indicando um efeito prejudicial das plantas GM em estudos in vitro e in vivo.

O artigo chama a atenção pelo forte apelo visual das imagens de ratos portando grandes tumores, associados à alimentação com a ração contendo milho GM. O impacto científico, político e econômico dos resultados divulgados nesta publicação exige sua análise em maior detalhe. Desta forma, serão salientados a seguir vários aspectos com relação à metodologia empregada e conclusões obtidas.

2 Metodologia utilizada

Para a avaliação da toxicidade de longo prazo, foram empregados ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas, alimentados por 2 anos com rações à base de milho geneticamente modificado (GM) e tolerante ao Roundup (R) (NK603), cultivado ou não com o herbicida (3 L ha⁻¹; 540 g/L de glifosato). A ração padronizada (AO4; Safe; França) foi preparada para conter 11, 22 ou 33% de milho GM cultivado ou não com R, ou 33% da linhagem isogênica de milho não transgênico (ração controle). As concentrações do transgene foram confirmadas em cada ração por qPCR. Da mesma forma, foram determinados resíduos de R nos tecidos por espectrometria de massa.

O protocolo do estudo envolveu 20 grupos experimentais, cada um com 10 animais. Doze grupos constituídos por ratos machos (6 grupos) ou fêmeas (6 grupos) ingeriram cada um deles rações preparadas com as diferentes concentrações crescentes de NK603 cultivado ou não com R (11, 22 ou 33% de milho), respectivamente. Outros dois grupos, um de machos e outro de fêmeas, ingeriram a ração controle pelo mesmo período (33% de milho). Finalmente, seis outros grupos experimentais (3 com machos e 3 com fêmeas) receberam também a ração controle, mas tiveram que ingerir em seus bebedouros, cada um deles, água suplementada com 1,1 x 10⁻⁸%, 0,09% ou 0,5% de R, respectivamente.

No decorrer dos 2 anos do estudo foram obtidas 11 amostras de sangue dos animais, sob anestesia com isoflurano, para a realização de 31 análises bioquímicas. Da mesma forma,

foram coletadas 11 amostras de urina de 24 horas, que foram quantificadas quanto a 16 parâmetros. No momento da eutanásia dos animais por exsanguinação, sob anestesia com isoflurano, foram também colhidas amostras de fígado para realização de 3 análises bioquímicas diferenciadas. Além disso, também foram obtidas amostras de 36 diferentes tecidos, incluindo das neoplasias, para avaliação anatomopatológica sob coloração com H&E. Amostras de rins, fígados e neoplasias foram submetidas à microscopia eletrônica de transmissão. Quando necessário, devido a aspectos éticos (tais como perda de 25% do peso corpóreo [p.c.], presença de neoplasias com mais de 25% do p.c., ocorrência de hemorragias ou prostração), os ratos foram submetidos à eutanásia no decorrer do estudo. Utilizou-se basicamente estatística descritiva com análise discriminante.

A avaliação mais detalhada dos materiais e métodos empregados no estudo demonstra a existência de importantes limitações, conforme descrito a seguir:

2.1 Quanto à escolha dos animais experimentais:

Foram empregados ratos de laboratório da linhagem Sprague-Dawley de ambos os sexos e com cinco semanas de idade no início do experimento (jovens adultos).

A linhagem Sprague-Dawley tem sido utilizada desde a década de 70 como um ótimo modelo para estudo de toxicidade de diversas substâncias, inclusive permitindo a indução de tumores para a elaboração de modelos biológicos para estudos com substâncias anticancerígenas. Entretanto, seu uso em estudos de longa duração, em especial naqueles em que se utiliza como parâmetro o desenvolvimento de tumores, não parece ser adequado. Tal questionamento baseia-se no fato de que esta linhagem, assim como outras de ratos de laboratório, apresentam naturalmente alta incidência de tumores à medida que atingem a menopausa (450-540 dias de vida) e, subsequentemente, a senilidade (600-800 dias de vida).

A frequência de tumores mamários espontâneos em ratos varia conforme a linhagem, sendo entretanto menor em animais das linhagens Wistar, Long-Evans, Noble, WAG/Rij e BN/BiRij (Walsh e Poteracki, 1994; Poteracki e Walsh, 1998; Sommer, 1997; Cheung et al. 2003; Solleveld et al. 1986) que na linhagem Sprague-Dawley, na qual a frequência destes tumores é maior (Solleveld et al., 1986; Hotchkiss, 1995; Durbin et al., 1966; Kaspareitt e Rittinghausen, 1999).

Apesar de apresentarem metabolismos bastante distintos, no que se refere ao desenvolvimento de tumores, os ratos machos também apresentam elevada incidência de tumores em idade avançada. Drori e Folman (1976) apontam para a ocorrência natural de tumores em 10.4% dos ratos machos analisados. De fato, os dados do estudo de Seraliniet al. ratificam a observação histórica e consagrada da alta incidência de tumores em linhagens de ratos de laboratório, assim como da maior incidência em fêmeas quando comparadas aos machos nessa linhagem (Figuras 1 e 2), estando de acordo com os relatos da literatura científica.

Baseado nos fatos acima expostos, o artigo ora sob análise comete importante equívoco ao propor delineamento experimental para avaliação de incidência de tumores na linhagem de ratos Sprague-Dawley, em idades e estados fisiológicos e em órgãos corporais inadequados para a formulação de hipóteses e conclusões quanto aos efeitos cancerígenos das substâncias testadas.

Além disso, o emprego da linhagem de ratos Sprague-Dawley pode levar a conclusões distorcidas no que se refere aos dados coletados de animais de idade mais avançada no que concerne à incidência de tumores. Neste sentido, a sugestão dos autores de maior ocorrência de neoplasias nos animais tratados perante aos controles (e sob a qual se assenta o foco das discussões do artigo) pode ser decorrente de uma incidência natural de tumores em animais na

menopausa e/ou senis, por exemplo. Portanto, os dados coletados a partir dos 180-200 dias de idade possuem baixa representatividade para o monitoramento dos efeitos das substâncias testadas.

Igualmente, quando se considera os órgãos analisados: trato hepato-digestivo, rins, glândula mamária e hipófise, é extremamente difícil, se não impossível, distinguir a causa da ocorrência de tais tumores nos grupos experimentais analisados neste trabalho. É preciso ressaltar que esses tumores apresentam tendência natural de ocorrência na fase senil ou são hormônio-dependentes, influenciados pelos ciclos hormonais ultradianos – como: puberdade e menopausa.

2.2 Quanto ao número de animais experimentais utilizados

Dadas as restrições apontadas com relação a espécie animal utilizada no estudo em questão (linhagem, idade e órgãos), o uso de 200 animais, divididos em 10 grupos experimentais de cada sexo, fez com que as análises estatísticas fossem implementadas em grupos experimentais com apenas 10 animais por tratamento/sexo. Ainda que esse número seja aceito e recomendado para estudos de toxicidade em ratos, inclusive conforme apontado na Tabela 1 do artigo, indicando estudo prévio (Hammond et al. 2004) e marcos regulatórios, a existência de diversos fatores que podem perturbar as análises dos parâmetros avaliados, o tamanho amostral deveria ser substancialmente ampliado.

O uso de 10 animais por grupo experimental é recomendado, no caso de estudos de toxicidade em ratos, quando se utiliza animais adultos jovens, ou seja fora das faixas etárias/momentos fisiológicos onde a incidência de tumores é naturalmente muito alta. Neste caso, quando são identificadas alterações na incidência de tumores num estudo delineado dessa forma, deve-se promover investigações subsequentes para se avaliar os eventuais efeitos negativos das substâncias testadas para a saúde animal.

O estudo em análise pretendeu ir além do que preconizam os marcos regulatórios e estudos anteriores, ao propor o prolongamento do tempo de acompanhamento e aumento do número de análises efetuadas nos animais submetidos a tratamentos com milho transgênico NK603 e defensivo agrícola Roundup. Entretanto, os autores não só se equivocam na escolha do modelo animal (ratos da linhagem Sprague-Dawley), conforme exposto acima, mas persistem no equívoco ao não proporem alternativas para contornar os efeitos decorrentes do emprego dessa linhagem de ratos, tais como: maior número de animais experimentais (grupos tratamento e controle) e o emprego de animais castrados, que poderiam eventualmente diminuir o efeito das interferências hormonais nas análises.

2.3 Quanto aos métodos estatísticos utilizados

O principal questionamento em relação à análise estatística dos dados do trabalho, consiste em que, tendo-se analisado variáveis contínuas, por que não foi utilizada a análise de variância entre os grupos? Nesse caso poder-se-ia identificar diferenças significativas entre os grupos para cada uma das variáveis investigadas. Esta informação não está clara nos resultados apresentados no artigo. Vale ressaltar que isto pode facilmente confundir o leitor quanto ao verdadeiro significado de eventuais diferenças mencionadas pelos autores.

Assim, em detrimento dos métodos estatísticos clássicos e convencionais para experimentos nos moldes dos que foram realizados no presente trabalho, os autores empregaram análises multivariadas diversas, justificando sua "...robustez na modelagem, análise e interpretação de dados químicos e biológicos complexos... (sic)". Esse tipo de estatística, que envolve métodos tais como Análise de Componentes Principais (PCA) e Quadrados Mínimos em amostras com estruturação (PLS e OPLS), é de fato muito utilizada em conjuntos de dados biológicos

complexos, que contenham por exemplo milhares de informações de e/ou amostras. Esses métodos servem para agrupar dados associados/correlacionados, permitindo inferências sobre a resposta a um determinado fator. Nos casos envolvendo a bioinformática por exemplo, tais métodos são frequentemente utilizados para estudar associações de porções do genoma com um dado fenótipo em uma população, criando assim hipóteses a serem posteriormente investigadas.

No trabalho em questão, os dados apresentados não se configuram como "...dados biológicos complexos...(sic)" conforme descrição dos autores, dado o pequeno número amostral e de análises efetuadas. O emprego de métodos estatísticos convencionais (adequados ao estudo em questão), tais como a Análise da Variância (ANOVA), provavelmente revelaria a não significância das diferenças numéricas observadas. Por essa razão, entendemos ser equivocada a decisão de aplicar os métodos estatísticos propostos sem a prévia apresentação dos resultados oriundos das análises estatísticas convencionais (ANOVA). Estes últimos deveriam funcionar como um primeiro filtro da pertinência das observações.

Limitações adicionais da metodologia:

(a) No item 2.2, foi informado que todas as rações consistiam em dietas balanceadas, com composição química equivalente exceto em relação ao transgene e sem contaminações por pesticidas. Entretanto, não foi mencionado com que frequência eram realizados estes controles, se as rações foram preparadas a partir dos mesmos lotes de milho, ou com que frequência e de que forma estas foram armazenadas. Nesse sentido, e em se tratando de estudo da repercussão da ingestão crônica de rações, deveriam ter sido consideradas as mensurações de eventuais concentrações de aflatoxina(s), por exemplo. Além disso, uma tabela com a composição centesimal das rações deveria ter sido apresentada no trabalho.

(b) No item 2.3 os autores mencionam que os animais foram monitorados duas vezes por semana, inclusive em relação a seus pesos corpóreos individuais e consumo de ração e água. No entanto, esses dados não foram apresentados (apesar dos autores mencionarem que não ocorreram diferenças quanto ao consumo de ração e p.c.; ver p. 4), o que deixa muito a desejar, especialmente neste tipo de pesquisa, uma vez que impossibilita ao leitor a conclusão da necessidade ou não no estudo de grupos "pair-feeding" adicionais para controle, por exemplo, da ocorrência de eventual alteração nutricional nos animais. Reconhecidamente, alterações para mais ou menos na ingestão de calorías (e conseqüente alteração no p.c.), por exemplo, têm influência na ocorrência de neoplasias. A ingestão de R suplementado na água dos animais não alterou, porventura, a ingestão de ração por parte dos mesmos e seus pesos corpóreos?

(c) A proporção de milho geneticamente modificado ou não na ração contraria as normas internacionais de nutrição de animais de laboratório, nas quais só é permitido administrar uma substância teste até no máximo 10% da ração, sob o risco de alterar o balanceamento da mesma. De fato, 11, 22 e 33% de substância teste são concentrações inaceitáveis na dieta de roedores, ainda que se trate simplesmente de milho. Ainda, quanto à proporção dos elementos teste na ração, o FDA (FDA Redbook 2000) orienta a adoção de procedimentos que não constam neste trabalho: "Whenthe test substance has no caloric value and constitutes a substantial amount of the diet (e.g., more than 5%), both caloric and nutrient densities of the high dose diet would be diluted in comparison to the diets of the other groups. As a consequence, some high dose animals may receive higher test article doses than expected because animals fed such diluted diets ad libitum may eat more than animals in other dosed groups to compensate for the differences in energy and nutrient content of the high dose diets. Such circumstances make it especially important that feed consumption of these animals be as closely and accurately monitored as possible in order to determine whether changes observed could be due to over

toxicity of the test substance or to a dietary imbalance. To further aid in this assessment, two control groups can be used; one group would be fed the undiluted control diet and a second group would be fed the control diet supplemented with an inert filler (e.g., methylcellulose) at a percentage equal to the highest percentage of the test substance in the diet.”

Esta análise dos materiais e métodos utilizados no estudo mostra que, para que o trabalho pudesse sustentar as conclusões (de que as substâncias testadas – milho GM e Roundup, causam danos à saúde dos animais), seriam necessárias a implementação sequencial e incremental de todas as ações abaixo, descritas no âmbito dos Materiais e Métodos:

- a. Uso de linhagem de animais experimentais que não apresentasse altas taxas de incidência de tumores, como a que ocorre nos ratos da linhagem Sprague-Dawley, seguido de:
- b. Uso de animais castrados para atenuar os efeitos hormônio-dependentes de ocorrência natural, no aumento da incidência de tumores, seguido de:
- c. Aumento mínimo de dez vezes no número de animais experimentais utilizados em cada grupo testado para permitir a análise estatística eficiente, seguido de:
- d. Uso de métodos estatísticos tradicionais (ANOVA) para aceitar ou rejeitar a hipótese de que as substâncias testadas causam efeito negativo à saúde dos animais, antes de qualquer especulação estatística adicional.

Após a realização de todas essas etapas, caso fosse observado desvio do esperado e com significância estatística, seria possível estabelecer conclusões pertinentes. Sem essa abordagem, os dados apresentados no estudo são inconclusivos e não permitem a formulação de novas hipóteses de investigação, não alterando o status quo do conhecimento nessa área.

3 Resultados

A descrição dos resultados apresenta sérias limitações, impossibilitando a correta avaliação dos dados:

3.1 Mortalidade

As descrições sobre os dados de mortalidade nos remetem às Figuras 1 e 2. Através delas os autores pretendem demonstrar diferenças nas taxas de mortalidade entre os grupos, as quais são discutidas no corpo do texto no item “3.1 Mortality”.

Além das críticas feitas no item anterior (quanto a escolha da espécie animal, delineamento experimental e análise estatística), que por si só já descredenciariam o estudo, observamos que os autores se utilizam das expressões “times” ou “fold” sempre que querem expressar a magnitude da diferença entre o observado em um grupo tratado quando comparado ao controle. Seria razoável esperar que os autores apresentassem o nível de significância dos testes estatísticos aplicados aos dados coletados, simplesmente informando se os grupos diferiam ou não, o que não se verifica dada inexistência da análise estatística apropriada (ANOVA). Por exemplo, uma das frases mais impactantes do resumo do artigo diz que “*all treated groups died 2–3 times more than controls, and more rapidly*” - entretanto, não há análise estatística que indique se com os números de animais usados (20 no grupo controle, versus 180 nos grupos tratados) há diferença com significância estatística. Além disto, a Figura 1 em si é muito ilustrativa mas muito pouco informativa - não tem média, desvio padrão ou outras informações que dêem consistência ao significado dos resultados de um experimento.

Assim, dada a escolha equivocada da estratégia de análise estatística, toda e qualquer argumentação que se estabeleça a partir do exposto é apenas especulativa. Portanto, todas as conclusões sobre o efeito negativo das substâncias testadas na saúde dos animais (medidas através da taxa de mortalidade) não fazem sentido, pois o que foi observado e da forma como foi analisado, não permitem fazê-las.

3.2 Observações anatomopatológicas

A descrição dos resultados anatomopatológicos (item 3.2) foge em vários aspectos aos padrões convencionais de publicações científicas. Na segunda frase deste item, os autores dizem “*All data cannot be shown in one report, and the most relevant are described here.*” A escolha do que é “mais relevante” pode ser muito subjetiva, invalidando os resultados. A análise e a terminologia empregada quanto aos “tumores” é bastante incompleta. Exemplificando, não foram utilizados termos e avaliação de parâmetros como a “latência”, incidência” ou “multiplicidade” de neoplasias, o que seria necessário no texto e na Tabela 2. Além disso, novamente os autores fazem uso de termos como “times” e “fold” para expressar a magnitude das supostas diferenças entre o que foi observado entre os grupos experimentais, em detrimento de uma resposta objetiva indicando se houve ou não diferença significativa entre os tratamentos.

Apesar da importância dada ao surgimento de tumores, o artigo não informa a frequência com que estes tumores são encontrados em animais tratados ou controle. O texto (página 4, 4º parágrafo) utiliza descrições vagas como “*10–30% of treated females per group developed tumors*”, “*50–80% of female animals had developed tumors in all treated groups*” ou “*70–80% of animals presented 1.4–2.4 times more abnormalities than controls*”. A Tabela 2, que fornece números, refere-se também de modo pouco preciso a “*most frequent anatomical pathologies observed*”, sem indicar o número total de animais por grupo (que deve ter variado, já que houve mortes ao longo do estudo - cujo número em cada grupo, também não é indicado). Os tumores são fartamente ilustrados na Figura 3, mas novamente, não são apresentados números precisos sobre sua frequência nos animais tratados ou controles, ou ainda significado estatístico dos números de tumores encontrados.

Assim, à parte do já exposto anteriormente com relação aos erros de delineamento, por exemplo por não considerar os efeitos confundidores na medida da incidência de tumores ou evitar a estatística convencional (ANOVA), os autores oferecem ao leitor um simples levantamento anatomopatológico da ocorrência de tumores nos ratos, descrevendo tipos, órgão afetados e outras descrições, uma vez que os tratamentos não apresentaram qualquer desvio do esperado (comprovando a inocuidade das substâncias testadas).

3.3 Análises bioquímicas

A afirmação de que as análises bioquímicas também sugerem a manifestação de alterações patológicas decorrentes dos tratamentos com as substâncias testadas (milho OGM e defensivo agrícola Roundup) é baseada em avaliações estatísticas questionáveis e pouco precisas. Por exemplo, na primeira frase da página 6 consta que “*In addition, cytochrome activities also generally increased in the presence of R (Roundup)...*” Este “geralmente” seria adequado se estivesse descrevendo uma tabela com apresentação dos números, o que não existe; esta é a única descrição dos resultados. Outros erros de interpretação podem ser identificados. A afirmativa feita ao final da página 6, “*The GM maize fed group either with or without R application (in plants) showed a reduced transcription in mRNA and rRNA because of higher heterochromatin content, and decreased nucleolar dense fibrillar components.*”, por exemplo, não tem procedência. Uma evidência citológica como “maior conteúdo de heterocromatina” ou “menos componentes nucleolares”, principalmente sem avaliação quantitativa, não justifica qualquer conclusão sobre o grau de transcrição de RNA mensageiro ou ribossomal.

A menção a efeitos disruptores endócrinos nos parece também imprudente e destituída de fundamentação frente aos resultados encontrados. A avaliação de efeitos de interferência com o sistema endócrino pode ser feita por meio do teste OECD 407 - *Report of the validation of the updated test guideline 407: repeat dose 28-day oral toxicity study in laboratory rats*. Nenhum resultado apresentado nos parece correlacionar-se com alterações em

glândulas endócrinas em decorrência da administração de milho geneticamente modificado a ratos SpragueDawley.

Assim, se os dados de mortalidade e ocorrência de lesões anatomopatológicas (tumores) já não possuíam base sólida para justificar a ocorrência de efeito tóxico das substâncias testadas, os dados de bioquímica sérica seguem na mesma linha por identificar, empregando métodos estatísticos não convencionais, alterações no âmbito do sistema renal e endócrino, relacionando-os como efeito dos tumores existentes em alguns animais.

Em conclusão, a avaliação dos resultados demonstra uma tendência à exposição apenas do que favoreceria a tese de que as substâncias testadas (milho NK603 e Roundup) teriam efeitos tóxicos sobre a saúde dos animais. A estatística básica sobre os dados de mortalidade (ANOVA) não é apresentada, figuras que não contribuem para a elucidação dos fatos são exploradas como se fossem resultados científicos novos e a análise das alterações dos perfis bioquímicos é duvidosa, uma vez que defende a tese de que as mesmas são causadas pelos tumores, que tem alta possibilidade de serem inerentes ao crescimento dos ratos da linhagem Sprague-Dawley.

4Referências bibliográficas

Cheung SY, Choi HL, James AE, Chen ZY, Huang Y, Chan FL. Spontaneous mammary tumors in aging Noblerats. *Int J Oncol.* 2003 Feb;22(2):449-57.

Domingo JL, GinéBordonaba J. A Literature review on the safety assessment of genetically modified plants. *Environ Int.* 2011;37(4):734-42.

Drori D, Folman Y. Environmental effectsonlongevity in the male rat: exercise, mating, castrationandrestrictedfeeding. *ExpGerontol.* 1976;11(1-2):25-32.

Durbin PW, Williams MH, Jeung N, Arnold JS. Developmentofspontaneousmammarytumors over thelife-spanofthefemale Charles River (Sprague-Dawley) rat: theinfluenceofovariectomy, thyroidectomy, andadrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res.* 1966 Mar;26(3):400-11.

FDA Redbook 2000: IV.B.1 General Guidelines for DesigningandConductingToxicityStudies. November 2003. ToxicologicalPrinciples for theSafetyAssessmentofFoodIngredients. ChapterIV.B.1. General Guidelines for DesigningandConductingToxicityStudies. Acessado em <http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/foodingredientsandpackaging/redbook/ucm078315.htm> 15/10/2012.

Hammond B, Dudek R, Lemen J, Nemeth M. Resultsof a 13 weeksafetyassurancestudywithratsfedgrainfromglyphosatetolerantcorn. *FoodChemToxicol.* 2004 Jun;42(6):1003-14.

Hotchkiss CE. Effectofsurgicalremovalofsubcutaneoustumorsonsurvivalofrats. *J AmVetMed Assoc.* 1995 May 15;206(10):1575-9.

Kaspereit J, Rittinghausen S. Spontaneousneoplasticlesions in HarlanSprague-Dawleyrats. *ExpToxicolPathol.* 1999 Jan;51(1):105-7.

Keenan KP, Ballam GC, Dixit R, Soper KA, Laroque P, Mattson BA, Adams SP, Coleman JB. The effectsof diet, overfeedingandmoderatedietaryrestrictiononSprague-Dawleyratsurvival, diseaseandtoxicology. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):851S-856S

Poteracki J, Walsh KM. Spontaneousneoplasms in controlWistarrats: a comparisonofreviews. *ToxicolSci.* 1998 Sep;45(1):1-8.

Snell C, Bernheim A, Bergé JB, Kuntz M, Pascal G, Paris A, Ricroch AE. Assessmentofthehealthimpactof GM plant diets in long-termandmultigenerational animal feedingtrials: a literaturereview. *FoodChemToxicol.* 2012;50(3-4):1134-48.

Solleveld HA, van Zwieten MJ, Broerse JJ, Hollander CF. Effectsof X-irradiation, ovariohysterectomyand estradiol-17 beta onincidence, benign/malignantratioandmultiplicityofratmammaryneoplasms--a preliminary report. *Leuk Res.* 1986;10(7):755-9.

Sommer MM. Spontaneousskinneoplasms in Long-Evansrats. *ToxicolPathol.* 1997 Sep-Oct;25(5):506-10.

Walsh KM, Poteracki J. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1994 Jan;22(1):65-72.

Flávio Finardi Filho
Presidente da CTNBio