

## **Análise da publicação que associa consumo de milho GM e de Glifosato ao desenvolvimento de tumores em ratos**

Eduardo Romano<sup>1</sup>, Flavio Zambrone<sup>2</sup>, Franco Lajollo<sup>3</sup>, Lucia de Souza<sup>4</sup>, Marcelo Gravina<sup>5</sup>, Paulo Paes de Andrade<sup>6</sup>

1. PhD em Ciências Biológicas- Biologia Molecular - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN
2. PhD em Medicina – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Diretor científico do ILSI Brasil e membro da Academia Americana de Toxicologia Clínica.
3. PhD em Ciência dos Alimentos – Universidade de São Paulo (USP) – e pós-doutor pela Massachusetts Institute of Technology. Membro titular da Academia de Ciências do Estado de São Paulo.
4. PhD em Ciências Biológicas- Biologia Molecular - Public Research and Regulation Initiative - PRRI
5. PhD em Fitopatologia e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
6. PhD em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Membro da CTNBio (2006 -2012)

### **Introdução**

A revista *Food and Chemical Toxicology* publicou, em sua edição de setembro de 2012, um estudo que sugere que tanto uma variedade de milho geneticamente modificada (GM) resistente a herbicida quanto o próprio herbicida provocam o desenvolvimento de tumores em ratos e precipitam sua morte. A pesquisa contou com o apoio do *Comité de Recherche et d'Information Indépendantes sur le génie GENétique* (CRIIGEN), grupo contrário ao uso da engenharia genética, fundado por Gilles-Eric Seralini, principal autor do trabalho.

O lançamento do estudo foi seguido por uma intensa repercussão nos meios de comunicação em nível internacional, incluindo diversos depoimentos de cientistas que contestaram o trabalho. A preocupação da comunidade científica e o seu posicionamento são plenamente justificados pelas imprecisões estatísticas e falhas metodológicas identificadas na pesquisa.

É relevante ressaltar que o estudo contradiz a conclusão consolidada pelas principais instituições de pesquisa com OGMs do mundo, de que os alimentos transgênicos são tão seguros quanto suas variedades convencionais. A comunidade científica e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) pedem que os autores da pesquisa

compartilhem os dados primários que alicerçam tais resultados, a fim de que essas novas conclusões possam ser avaliadas com detalhes. Diante da recusa, uma petição científica online solicitando que as informações venham à público foi organizada para permitir o processo usual de revisão e avaliação sobre a consistência das conclusões.

Mesmo com a análise preliminar, relevantes aspectos do estudo estão sendo questionados do ponto de vista técnico e científico, e que colocam em xeque as conclusões apresentadas pelo grupo francês.

## **Principais questionamentos à publicação**

### **Toxicidade de Longo Prazo do Herbicida Roundup e uma variedade de Milho Geneticamente Modificada Resistente a Roundup**

Gilles-Eric Séralini, Emilie Clair, Robin Mesnage, Steeve Gress, Nicolas Defarge, Manuela Malatesta, Didier Hennequin, Joël Spiroux de Vendômois  
*Food and Chemical Toxicology*, 2012

## **Delineamento experimental, metodologia, análise e interpretação dos resultados**

### 1. Análise estatística

A análise estatística diverge consideravelmente de qualquer abordagem técnica, e não estabelece relevância toxicológica. O número de animais por tratamento (n=10 para cada grupo) é muito pequeno. O número de animais necessários para verificar se há um efeito real e não apenas uma variação na incidência de tumores instantâneos para uma linhagem como essa (com alta incidência de tumores espontâneos) teria que ser maior para que pudesse ser representativo. De fato, um grupo de 10 é muito inferior ao que as diretrizes internacionais, como da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), sugerem. Segundo esse parâmetro, a quantidade de animais deveria ser de 50 animais para esse tipo de estudo (ver OECD). O estudo também não realizou análises estatísticas simples, a exemplo do desvio padrão, para verificar se as diferenças eram ou não aleatórias. Uma simples análise estatística mostra que o resultado obtido está dentro das variações de incidências esperadas para um grupo tão

pequeno desses roedores nessa faixa etária, mesmo sem nenhum tratamento.

## 2. Linhagem de roedor Sprague-Dawley e propensão a câncer

A linhagem de rato Sprague-Dawley tem sido amplamente empregada em estudos toxicológicos. No entanto, esta cepa é há muitos anos conhecida pela alta propensão ao desenvolvimento de tumores primários espontâneos. Tal característica é ainda mais pronunciada quando os animais podem comer à vontade e envelhecem. No estudo de Seralini et al., as taxas de mortalidade e incidência de tumores observadas em todos os grupos estão dentro das normas históricas para esses de ratos de laboratório. Portanto, é esperado que, mesmo sem nenhum tratamento, sejam observados os mesmos efeitos. Por exemplo, Davis et al. (1956) relataram que 57% de fêmeas desta linhagem de roedores desenvolveram tumores durante o seu período de vida, com uma incidência elevada em tecidos mamários. A incidência tumoral foi maior (80%) nas fêmeas alimentadas com a dieta rica em gordura. Thompson et al. (1961) relataram uma incidência de tumores espontâneos em 41% para o sexo masculino e feminino combinados. Prejean et al. (1973) relataram a incidência de tumores em 45% para o sexo masculino e feminino combinados com mais de 18 meses de idade. Suzuki et al. (1979) relataram a manifestação de tumores espontâneos em 81% dos ratos que sobrevivem mais de 24 meses. Keenan et al. (1995) relataram tumores espontâneos em até 87% das fêmeas e até 71% dos machos com dieta abundante, enquanto a restrição dietética reduziu significativamente a incidência de tumores. Uma alimentação descontrolada e à vontade contribui significativamente para uma alta variabilidade e pobre reprodutibilidade de um estudo, limitando sua relevância na avaliação de risco (Keenan et al, 1999). Ratos em geral vivem uma média de 700 dias. Portanto, um estudo em ratos que se prolongue por 2 anos, é muito longo, independentemente da linhagem empregada.

## 3. Incidência de tumores e mortalidade

Ainda que os autores tenham disponibilizado gráficos de mortalidade acumulativa e incidência de tumores, não foi demonstrada a análise

estatística dos dados. A falta dessa análise estatística é inexplicável. Assim como é tendenciosa na interpretação dos dados. Por exemplo, nos casos dos animais machos, a mortalidade dos grupos alimentados com concentrações maiores de milho GM (22 e 33%) é menor em relação ao controle. Nos grupos de animais que receberam apenas o herbicida a mortalidade é maior no controle do que naquele com a dose mais alta de glifosato. Esses dados são exemplos que mostram exatamente o oposto do que foi concluído pelo grupo.

Igualmente, considerando o nível de alegações com respeito ao grau de doença nas populações de teste tanto de milho GM como glifosato, a ausência de demonstrativo de ganho de peso entre as populações controle e teste (dado não mostrado, mas citado pelos autores) é surpreendente.

#### 4. Dose efeito x resposta

Claramente não existe um efeito de dose x resposta. De acordo com as sugestões dos autores, seria esperado observar que quanto maior a concentração do milho GM, maiores deveriam ser os efeitos negativos. No entanto, os resultados do controle (33% de milho não GM) e a maior dose de milho GM (33% de milho GM) foram similares. Os autores atribuem esta observação a um possível efeito “limiar” que ocorreria já na dose de 11% de milho GM. Porém, não levantam a possibilidade de que os resultados similares entre o controle (33% de milho não GM) e a dieta com a maior dose de milho GM (33%) possam ocorrer em função dos animais terem sido alimentados com a mesma quantidade de milho. Caso o efeito de dose “limiar” fosse realmente uma hipótese, deveria ser suficientemente explicado através do uso de novas concentrações intermediárias entre o controle e a menor concentração de milho GM (11%).

#### 5. Formulação da dieta

Afim de possibilitar uma análise de efeito de um determinado tratamento, se preconiza a manutenção de condições experimentais entre os grupos investigados. Uma dieta desbalanceada, principalmente por longos períodos, obviamente não é indicada. Neste estudo, a quantidade de milho diferiu entre os tratamentos e entre alguns tratamentos e o controle. Os

tratamentos foram conduzidos com milho GM nas concentrações de 11%, 22% e 33%. Para cada uma dessas concentrações de milho deveria ter um grupo controle com igual quantidade de milho não GM, porém, o controle consistiu somente da concentração de 33% de milho não GM. Ou seja, não está claro se no caso das dietas com 11% e 22% de milho os animais receberam menos milho. Como essa informação não foi reportada, a conclusão possível é que os autores não usaram dietas balanceadas contendo 11% e 22% de milho não GM. Portanto, há um elemento adicional que poderia interferir nos resultados. Igualmente, não há relatos na metodologia do trabalho sobre o balanceamento das rações formuladas para equivalência de nutrientes, sobre análises químicas para controle da composição, métodos de conservação, no caso de lotes únicos para todo período experimental ou de formulação em lotes distintos. Uma contaminação do milho por micotoxinas, por exemplo, poderia promover o desenvolvimento de tumores.

Além disso, o milho foi tratado com Roundup na dose de 3L p.c./ha (540 g i.a./l). No entanto, os autores não apresentam informações sobre a quantidade de resíduos de glifosato no milho tratado, o que representaria a dose de exposição do estudo. Da mesma forma, se os animais receberam a formulação comercial de glifosato, deveria haver um controle com a formulação equivalente, sem glifosato. Com isso, se poderia atribuir o efeito ao glifosato e não a outros componentes da formulação.

## 6. Consumo da dieta

Não foram reportados os dados sobre o consumo de água ou de alimentos (dieta) pelos animais tratados. Esses dados são considerados essenciais para se entender a real dose administrada, a saúde dos animais envolvidos e a susceptibilidade a certos tumores. A desidratação por si só (advinda de problemas relacionados à ingestão de uma formulação de herbicida diluída em água) já traria efeitos biológicos não desejáveis. De fato, as doses de glifosato não foram reportadas em mg glifosato/kg p.c./dia. Os autores mencionam que a água foi trocada semanalmente. Não ficou claro se foi realizada uma análise para avaliar a estabilidade do glifosato na água.

## 7. Milho NK603 x milho convencional na dieta

O milho NK603 usado não foi especificamente caracterizado (nome da variedade) e, o milho convencional (não GM) somente foi identificado como “controle não transgênico mais próximo ao isogênico”. Os autores não citaram o nome do híbrido contendo o evento geneticamente modificado. Uma vez que diferenças genéticas entre os híbridos podem afetar os resultados, a identificação é essencial. Do mesmo modo é importante identificar a variedade isogênica, pois os resultados podem variar dependendo da variabilidade genética entre a variedade GM e o controle. Com esta descrição imprecisa não é possível certificar se o controle difere unicamente do milho GM devido à ausência do evento GM. Portanto, a precisa identidade genética e a origem das variedades seriam relevantes para reduzir as incertezas sobre os resultados. Tampouco existe uma clara descrição sobre a condição de cultivo, somente é mencionado que os milhos GM e não GM foram cultivados próximos. Vários aspectos de cultivo (ex: controle de insetos, doenças, fertilização e, outros) e de armazenagem correta do milho colhido podem afetar aspectos nutricionais e de sanidade dos grãos. Um aspecto muito importante é a possibilidade de ocorrência de micotoxinas, que podem causar patologias em animais similares às observadas pelos autores, quando boas condições de cultivo e armazenagem não forem observadas. No estudo esta possibilidade não foi verificada.

## 8. Análise de composição do milho

Os autores mencionam que o milho GM e não GM são substancialmente equivalentes, mas não deixam claro se a composição das dietas no que se refere ao milho foi analisada. Surpreendentemente, os autores mencionam somente a análise de flavonóides e compostos fenólicos. No caso de compostos fenólicos os autores encontraram diferenças importantes, que incluem uma menor concentração de fenólicos no milho NK603 e usaram este dado para explicar o surgimento dos tumores. Caso os autores estejam corretos sobre o efeito da redução de compostos fenólicos em relação ao maior surgimento de tumores, maior seria a necessidade de

que a composição do milho GM e não GM fosse completa e detalhadamente explicada. Afinal, sugere que variações bastante discretas na composição do alimento possam afetar os animais. Com isso, se poderia esperar que pequenas variações de tipo de solo, fertilização, variação de temperatura, ocorrência de doenças seriam bem mais importantes sobre a qualidade da dieta do que a única diferença de um gene entre o milho GM e não GM.

### 9. Proteína EPSPS

Não existe uma explicação plausível sobre um possível efeito da proteína EPSPS de origem vegetal e a mesma proteína EPSPS de origem bacteriana e presente no milho GM NK 603. A proteína EPSPS de origem bacteriana é insensível ao glifosato. Os autores mencionam a inibição de fenólicos pela ação do glifosato, mas não explicam como isto poderia ocorrer mesmo na ausência do herbicida no caso do tratamento unicamente com milho GM (sem tratamento com o herbicida). Outras possíveis explicações mencionadas pelos autores como perturbação da expressão gênica resultante do transgene e efeitos mutagênicos e metabólicos são meramente especulativas e não encontram base na literatura qualificada.

### **Considerações finais**

A publicação de Seralini et al afirma ser a primeira a investigar os efeitos de uso prolongado de OGM. No entanto, a afirmativa não é verdadeira. Vários estudos de longo prazo investigaram a segurança dos OGMs na alimentação de uma variedade de animais, incluindo galinhas, ratos, camundongos, codornas, macacos e peixes. De acordo com uma revisão recente de Snell et. al. (2012), nenhum efeito adverso foi observado em estudos de segurança alimentar de longo prazo. Esta revisão considerou avaliações de grupos científicos conceituados, incluindo a *National Academy of Sciences* e *Royal Society*, bem como dados da União Europeia com 25 anos de pesquisa em biossegurança com OGM. Além disso, durante as últimas décadas, bilhões de animais foram alimentados com uma dieta que inclui componentes derivados de plantas transgênicas, inclusive os ratos de

laboratório que são rotineiramente cuidados por profissionais e qualquer intercorrência decorrente do consumo de OGM já teria sido relatada.

Os autores contradizem os resultados de 25 anos de pesquisas sobre transgênicos conduzidos pela Comissão Europeia que mostraram que os transgênicos são tão seguros quanto suas variedades convencionais para a saúde e o meio ambiente. O relatório da Comissão Europeia “*EU Commission-sponsored Research on Safety of Genetically Modified Organisms (1985-2000)*” declarou que “a utilização de tecnologia mais precisa e o maior escrutínio da regulamentação torna os OGMs ainda mais seguros do que as plantas e os alimentos convencionais”. Outro relatório também da Comissão Europeia “Uma década de financiamento de pesquisas na União Europeia (2001-2010)” analisou projetos de pesquisa de mais de 400 grupos independentes e concluiu que “a biotecnologia, e em particular os OGMs, não apresentam por si maiores riscos para o meio ambiente ou para a alimentação quando comparados aos apresentados por tecnologias de melhoramento convencional de plantas”.

Contrariamente às sugestões dos autores, múltiplos estudos conduzidos durante toda a geração de diversos animais nos últimos 35 anos, demonstraram que o glifosato não promove o desenvolvimento de tumores em roedores (estudo de revisão: Mink et al., 2012). Sabidamente, o herbicida glifosato, que afeta uma enzima presente nas plantas, mas não em animais, tem um tempo de atuação reconhecido como curto no meio ambiente e uma longa história de utilização segura. Igualmente, os estudos epidemiológicos não validam os problemas de saúde levantados pelos autores em relação ao glifosato. Resultados epidemiológicos publicados sobre efeitos na saúde humana, incluindo câncer e efeitos reprodutivos, reforçam a falta de evidências que associam tais parâmetros ao uso do glifosato (estudo de revisão: Mink et al., 2011). Ainda, dados provenientes de inúmeros testes realizados *in vitro* e em animais demonstraram que o glifosato não promove descontrolado endócrino (Willians et al., 2012).

Resumidamente, o presente estudo não atende aos padrões mínimos aceitáveis para esse tipo de publicação científica. Num estudo de longa duração, vários fatores devem ser considerados para que os resultados possam ser validados, incluindo, por exemplo: (1) caracterização analítica da

substância testada de acordo com as normas vigentes, (2) apresentação de histórico de incidência de tumores e (3) análises estatísticas apropriadas, especialmente no que concerne às incidências de tumores (Ettlin & Prentice ,2002).

## Referências

- A decade of EU-funded GMO research (2001-2010), disponível em [http://ec.europa.eu/research/biosociety/pdf/a\\_decade\\_of\\_eu-funded\\_gmo\\_research.pdf](http://ec.europa.eu/research/biosociety/pdf/a_decade_of_eu-funded_gmo_research.pdf)  
[http://ec.europa.eu/research/biosociety/library/brochures\\_reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/research/biosociety/library/brochures_reports_en.htm)
- Davis, R. K., Stevenson, G. T. e Busch, K. A. (1956). **Tumor Incidence in Normal Sprague-Dawley Female Rats.** *Cancer Research* 16: 194-197.
- Keenan, K. P., Soper, K. A., Smith, P. F., Ballam, G. C. e Clark, R. L. (1995). **Diet, overfeeding, and moderate dietary restriction in control Sprague-Dawley Rats: I. Effects on Spontaneous Neoplasms.** *Toxicological Pathology* 23: 269-286.
- Keenan KP, Ballam GC, Soper KA, Laroque P, Coleman JB, Dixit R. (1999). **Diet, caloric restriction, and the rodent bioassay.** *Toxicol Sci.* 52 :24-34.
- Mink P.J., Mandel J.S., Lundin J.I. e Scurman B.K. (2011). **Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: A review.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61 (2): 172-184.
- Mink P.J., Mandel,J.S., Scurman, B. K. e Lundin, J.I. (2012). **Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63 (3): 440-452.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (1981). **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 451: Carcinogenicity Studies.** Disponível em <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/browseit/9745101E.PDF>
- Prejean, J. D., Peckham, J. C., Casey, A. E., Griswold, D. P., Weisberger, E.K. e Weisberger, J.H. (1973). **Spontaneous Tumors in Sprague-Dawley Rats and Swiss Mice.** *Cancer Research* 33: 2768-2773.
- Snell, C., Bernheim, A., Bergé, J.P., Kuntz M., Pascal G., Paris A., e Ricroch A. E. (2012). **Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review.** *Food and Chemical Toxicology* 50: 1134–1148

R.A. Ettlina\*, D.E. Prentice (2002). **Unexpected tumour findings in lifetime rodent bioassay studies—what to do?** *Toxicology Letters* 128 (2002) 17–33. *Review article.*

Suzuki, H., Mohr, U. e Kimmerle, G. (1979). **Spontaneous endocrine tumors in Sprague-Dawley rats.** *Journal of Cancer research and Clinical Oncology* 95: 187-196.

Thompson, S.W., Huseby, R.A., Fox, M. A., Davis, C.L., e Hunt, R.D. (1961). **Spontaneous Tumors in the Sprague-Dawley Rat.** *Journal of the National Cancer Institute* 27: 1037-1057.

Williams, A.L., Watson R.E. e DeSesso, J.M. (2012). **Developmental and Reproductive Outcomes in Humans and Animals After Glyphosate Exposure: A Critical Analysis.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 15 (1): 39-96.