



European Food Safety Authority

L'importanza degli studi sugli animali per la valutazione della sicurezza e degli aspetti nutrizionali degli alimenti e dei mangimi GM

Harry A. Kuiper

Member EFSA GMO Panel Working Group Food/Feed Safety

Former Chair EFSA GMO Panel

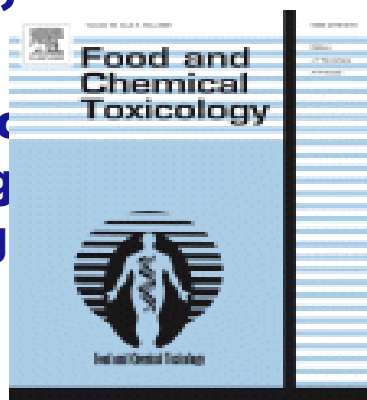
**Analisi del rischio di alimenti e mangimi
geneticamente modificati**

Marzo 31- Aprile 1 2015, Milano

- Test di alimentazione con alimenti e mangimi interi su roditori
 - Linee guida EFSA per i test a 90 giorni
 - Esempi di Test a 90 giorni già effettuati
 - Test di tossicità su pomodoro BT
 - Studi Seralini

“Safety and Nutritional Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed: The role of animal feeding trials”

**Report of
Working
Feeding**



**MO Panel
mal**

Guidance on conducting repeated- dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed

EFSA Scientific Committee

European Food Safety Authority (EFSA),
Parma, Italy

EFSA Journal 2011;9(12):2438

Difficoltà incontrate negli studi su alimenti/mangimi interi

- ☐ La naturale «grossezza» dell'alimento
 - I ratti mangiano i pomodori ?
- ☐ Dieta con alimenti/mangimi gustosa?
- ☐ Il raggiungimento della sazietà ?
- ☐ Necessità di mantenere il bilanciamento nutrizionale nella dieta
- ☐ Limite di massima somministrazione del materiale GM nella dieta al fine di prevenire lo sbilanciamento dei nutrienti (e delle tossine naturali)
- ☐ Effetto matrice

Quando sono I test sugli animali con gli
alimenti/mangimi interi necessari?

**EFSA Guidance 2011: studi di
sicurezza/alimentazione su *alimenti/mangimi interi* su
roditori durante 90 giorni**

Solo sulla base di:

Rilevanti differenze molecolari, composizionali, fenotipiche, agronomiche che necessitano di ulteriore caratterizzazione

Incertezze sulla possibile presenza di effetti non intenzionali

Possibili interazioni tra GM eventi combinati (stacked)

**REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 503/2013
DELLA COMMISSIONE: ... Il richiedente deve in ogni
caso includere uno studio di sicurezza/alimentazione
con un singolo evento GM o con eventi di
trasformazione stacked (obbligatorio)**

Protocollo per i test a 90 giorni (Linee guida EFSA adeguata del OECD)

◆ Linee Guida OECD (1998) 408, valutazione della tossicità subcronica delle *sostanze chimiche*

- 4 gruppi (controllo + 3 dosaggi: basso, medio ed alto)
 - 80 animali di entrambi i sessi
 - La dose più alta dovrebbe causare tossicità
 - Della dose più bassa si dovrebbe riportare il NOAEL (No-Adverse-Effect –Level)
- ❑ Sull'intero alimento è raccomandato l'uso di 2 sole dosi (alta e bassa) ed il controllo.

- ❑ Intake, aumento del peso , emocromo, test biochimici su sangue ed urina, test istopatologici e esame necroscopico limitato.
- ❑ Parametri immunologici ed ormonali sull'intestino caso per caso.

- ❑ Per il welfare e per ragioni scientifiche gli animali dovrebbero essere tenuti *in coppia* nelle gabbie.
- ❑ L'isolamento è stressante per il ratto:
 - Iperattività motoria
 - Incremento della variabilità del peso
- ❑ Implicazioni statistiche:
 - La gabbia con 2 animali è considerata l'unità sperimentale.

Numero di Test Animali per Test Gruppo

- ❑ Quale effetto di interesse scientifico dovrebbe essere preso in considerazione (portata dell'effetto)?
- ❑ Utilizzo del **“Standardized Effect Size”** (SES):
 - Differenza delle medie tra gruppi sottoposti al trattamento diviso della deviazione standard di ciascun gruppo (pooled SD)
 - Misura quantitativa della forza del esperimento
 -
 - Rapporto Segnale /Rumore
- ❑ Decisione a priori sull' accettabilità della portata dell'effetto (SES=1, 2)

Inclusion of Positive Control and/or Reference Groups

- ❑ **Gruppi di Controllo Positivi** per dimostrare la sensibilità del modello, es. La suscettibilità ad un effetto tossico di un composto tossico noto.
- ❑ **Gruppi di Controllo di Riferimento** (materiale non GM in commercio) forniscono il range di valori normali dei parametri valutati sperimentalmente.
- ❑ *Non è raccomandato* l'uso di gruppi di controllo di riferimento per i quali sono già disponibili dati di background storici (principio delle RRR).

- ❑ Le differenze dei parametri tra gruppi di controllo e gruppi trattati devono essere valutate sulla base della/delle:
 - Tendenze relativamente alle dosi
 - Possibili correlazioni tra i parametri testati
 - Presenza degli effetti in entrambi i sessi
 - Riproducibilità dei dati(altri studi)
 - Range di variabilità dei test parametri

Safety Assessment of the *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein CRYIA(b) Expressed in Transgenic Tomatoes

H. P. J. M. Noteborn¹, M. E. Bienenmann-Ploum¹,
J. H. J. van den Berg², G. M. Alink², L. Zolla³, A. Reynaerts⁴,
M. Pensa⁵, and H. A. Kuiper¹

¹Department of Risk Assessment and Toxicology, RIKILT-DLO,
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, Netherlands

²Department of Toxicology, Agricultural University Wageningen,
6700 AE Wageningen, Netherlands

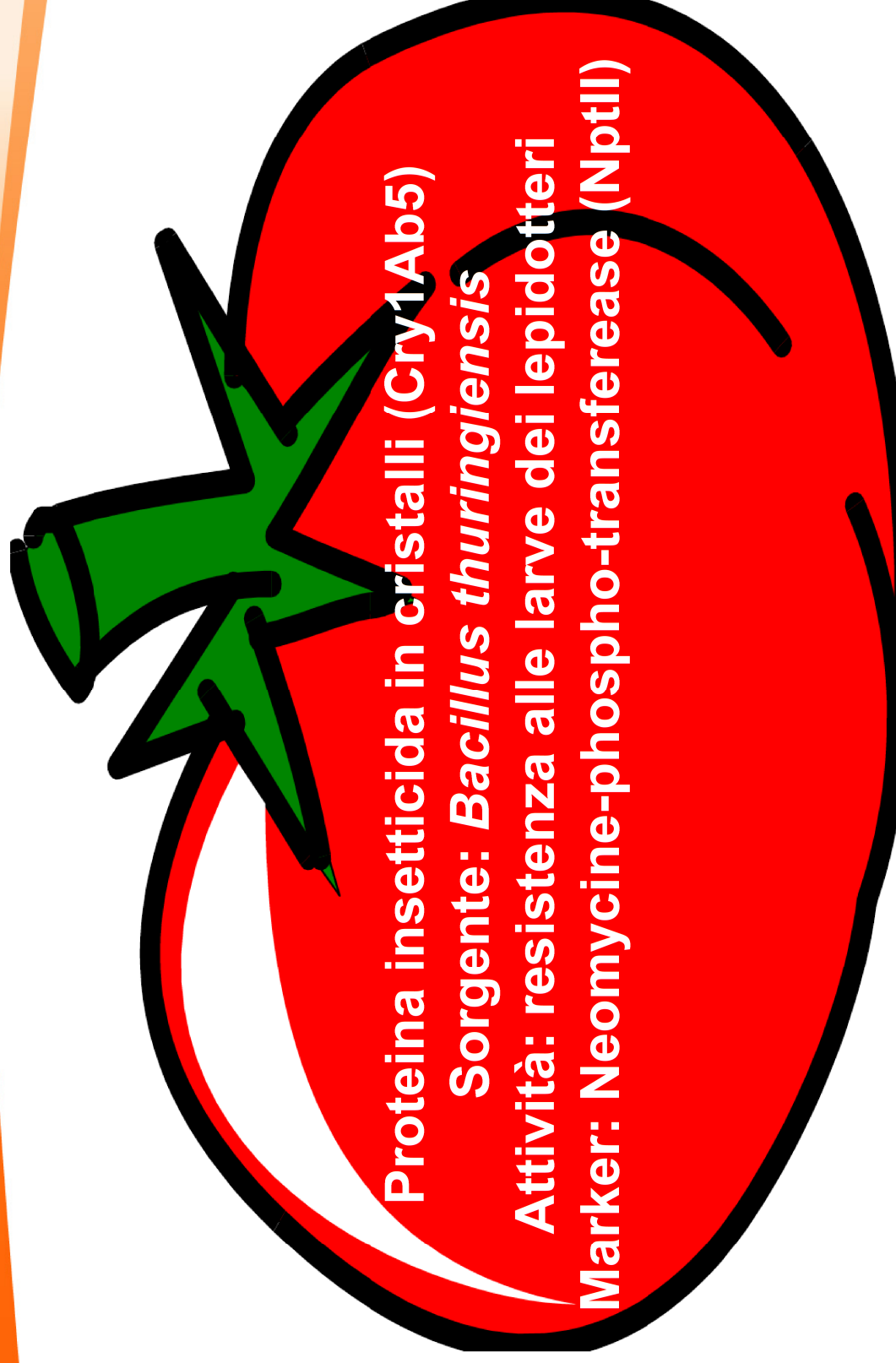
³Department of Environmental Sciences, University La Tuscia,
Viterbo, Italy

⁴Plant Genetic Systems, Jozef Plateaustreet 22, Ghent, Belgium

⁵SME Ricerche SCPA, La Fagianeria, Piana di Monte Verna, Italy

EU co-sponsored FLAIR project no. AGRF-0039

Valutazione della Sicurezza del Pomodoro Bt



STRUTTURA E FUNZIONE DELLA PROTEINA CRY

- ❑ Le delta-endotossine prodotte da alcuni ceppi del batterio Bacillus thuringiensis danneggiano il tratto digerente di alcuni insetti (MW of 27-140 kDa)
 - Attiva contro Lepidotteri, Ditteri e Coleotteri
- ❑ Le endotossine si legano all'epitelio intestinale causando lisi cellulare con formazione di canali catione-selettivi.

Cry1Ab5, MW 60 kDa, EMBL X04698

Met-Ala-



Asp-Leu-Gln-Pro-Ser-Leu-Leu-Ile-Asp



Test di valutazione della sicurezza della proteina CRYIA(b)

Cry1A(b)

- ☐ Legame al tessuto intestinale in vivo/in vitro di ratti, topi, scimmie rhesus e uomini monkey
- ☐ Degradazione proteolitica in vivo/in vitro
- ☐ Test di tossicità acuta
- ☐ 28-Giorni studi di tossicità in femmine di topo
- ☐ 31-Giorni studi di tossicità in conigli maschi
- ☐ Attività emolitica/tossicità cellule intestinali

Pomodoro-Bt

- ☐ Analisi singola/multi-composizionale
- ☐ Studi di alimentazione a 90 giorni nei ratti

Risultati della valutazione CRYIA(b)

- ❑ Nè *in vivo* nè *in vitro*, nessun legame della proteina nei frammenti di tessuto degli animali alimentati con la proteina CRY o nei tessuti incubati con proteina CRY
- ❑ Controlli positivi con larve di *Manduca sexta* sensibile alla proteina
- ❑ Estesa degradazione in-vitro (processo in due step)
- ❑ Estesa digeribilità della proteina CRY nel passaggio del tratto G.I.
- ❑ Nessun effetto avverso osservato negli studi a breve termine in topi e conigli

Dieta:

- Somministrazione della Proteina CRYIA(b) nel pomodoro liofilizzato
- 10% (p/p) di pomodoro liofilizzato nella dieta animale
- **Dose limitata: tossicità del potassio**
- Concentrazione finale della proteina CRYIA(b) nella dieta pari a 600 $\mu\text{g/kg}$
- Intake giornaliero di pomodoro liofilizzato nei ratti pari a 200 g pomodoro /kg peso corporeo

**Equivalente ad un consumo nell'uomo pari a
13 Kg di pomodoro Bt al giorno**

Risultati dello studio a 90 giorni con Pomodoro Bt nei ratti

Parametri tossicologici testati:

Consumo di acqua e cibo, peso corporeo, parametri clinici, ematologici, analisi delle urine, test istopatologici e esame necroscopico limitato.

Risultati

Nessuna differenza significativa o coerente nei test tossicologici ed istopatologici tra animali trattati e gruppi di controllo.

Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize

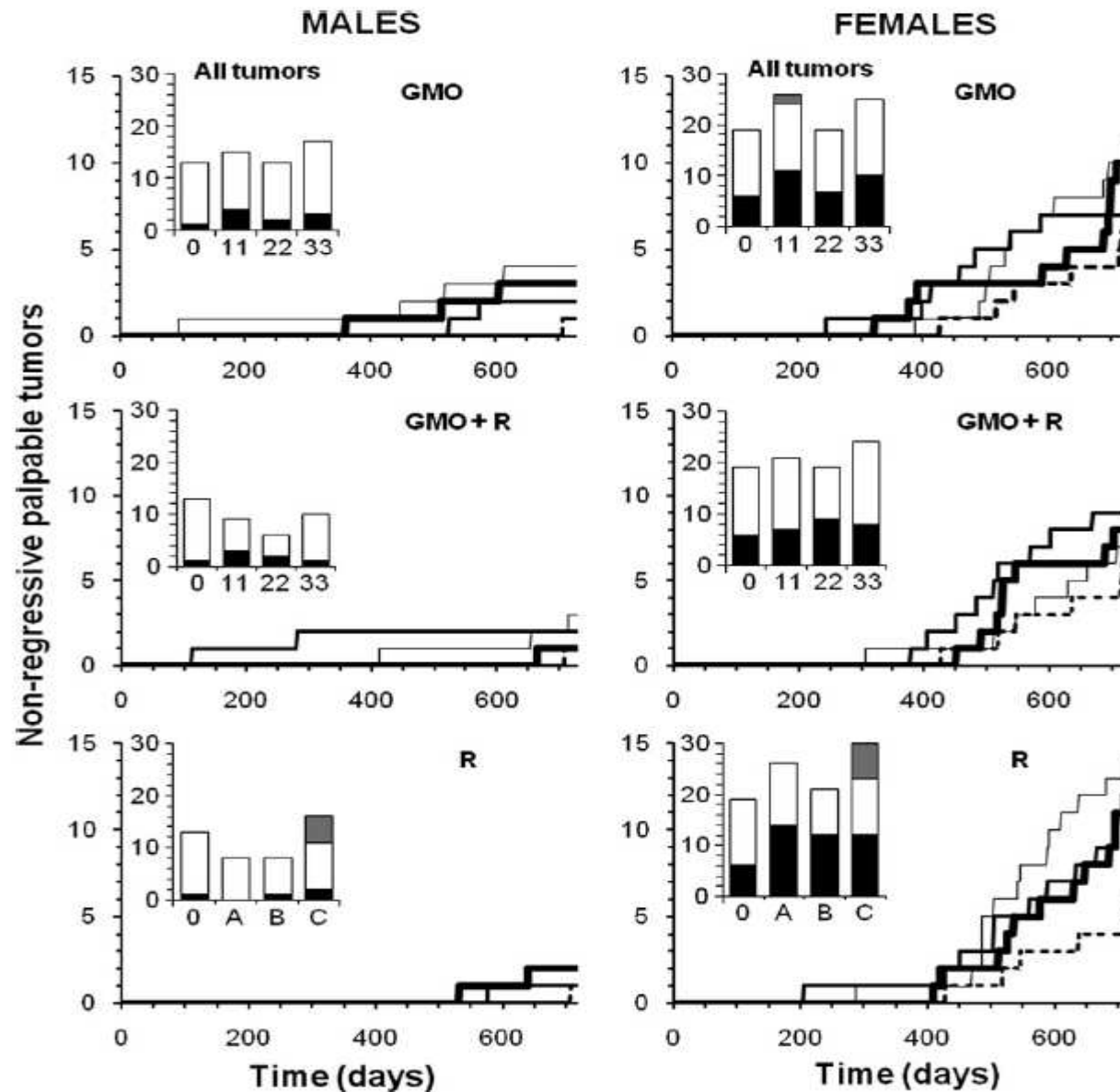
Gilles-Eric Séralini, Emilie Clair, Robin Mesnage, Steeve Gress, Nicolas Defarge, Manuela Malatesta, Didier Hennequin, Joël Spiroux de Vendômois

Food and Chemical Toxicology (2012), 50, 4221–4231

- ☐ Ratti del ceppo Sprague-Dawley alimentati per 2 anni con 11, 22 and 33% di Mais NK603 (tollerante all'erbicida glifosato), con o senza trattamento con erbicida.
- ☐ Trattamento con Roundup (0.1 ppb, 0.09% e 0.5%)
- ☐ Mais NK603 coltivato con o senza Roundup
- ☐ 10 maschi + 10 femmine per gruppo; 18 Gruppi trattati + 2 Gruppi di Controllo.

- Morte precoce in entrambi i sessi.
- Sviluppo di tumori mammari nelle femmine, ed compromissione della ghiandola pituitaria.
- Nei maschi trattati congestione epatica e necrosi 2.5–5.5 volte maggiore rispetto ai controlli.
- Severe nefropatie generalmente 1.3–2.3 maggiori rispetto ai controlli.
- I maschi presentano tumori palpabili 4 volte più voluminosi dei controlli e che si sviluppano circa 600 giorni prima.

Tumori nei ratti alimentati con mangime GM, non trattati, con e senza Roundup



Limitazioni dello studio(1)

- Uso di un ceppo di ratti che sviluppa spontaneamente tumori mammari.
- Numero limitato di animali nei singoli gruppi trattati (10♂+10♀)
- 18 gruppi trattati e 2 gruppi di controllo
- Nessuna relazione tra dose ed effetto (% GM mais/ sviluppo dei tumori)

Limitazioni dello studio(2)

- ❑ Mancanza dei gruppi di controllo di riferimento, dati relativi a variazioni naturali dei parametri testati, dati sulla frequenza spontanea dei tumori.
- ❑ Mancanza di dati sulle caratteristiche agronomiche, composizionali e fenotipiche del materiale GM e di controllo utilizzato per i test.
- ❑ Utilizzo di metodi statistici non convenzionali.
- ❑ Manca un'analisi "potente" (power analysis) antecedente lo studio

"Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize," by Gilles Eric Séralini et al. has been retracted by the Journal Food and Chemical Toxicology

Ripubblicato: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize, in Environmental Sciences Europe 2014, 26:14

<http://www.enveurope.com/content/26/1/14>

Commentary

New EU legislation for risk assessment of GM food: no scientific justification for mandatory animal feeding trials

Harry A. Kuiper^{1,*}, Esther J. Kok² and Howard V. Davies³

¹Formerly RIKILT Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands

²RIKILT Wageningen UR, Wageningen, The Netherlands

³The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland, UK

Received 22 March 2013;

revised 13 May 2013;

accepted 18 May 2013.

*Correspondence (fax +31 317 417717;
email harry.kuiper@wur.nl)

Summary

This commentary focuses on the potential added value of and need for (sub)-chronic testing of whole genetically modified (GM) foods in rodents to assess their safety. Such routine testing should not be required since, due to apparent weaknesses in the approach, it does not add to current risk assessment of GM foods. Moreover, the demand for routine testing using animals is in conflict with the European Union (EU) Commission's efforts to reduce animal experimentation. Regulating agencies in the EU are invited to respect the sound scientific principles applied to the risk assessment of foods derived from GM plants and not to interfere in the risk assessment by introducing extra requirements based on pseudo-scientific or political considerations.

Keywords: risk assessment, GM foods, EU legislation, animal feeding trials, European food safety authority.

- ❑ È altamente discutibile il potenziale valore aggiunto degli studi (sub)-cronici con alimenti GM interi
- ❑ Tali esperimenti dovrebbero essere effettuati solo se necessario (EFSA, 2011)
- ❑ L'obbligatorietà di questi test sono in conflitto con gli sforzi della Commissione UE di ridurre la sperimentazione con animali.
- ❑ Le Agenzie Regolatorie sono invitate a rispettare i principi scientifici validi e a non interferire nella fase di valutazione del rischio.

Statement of EFSA

**Explanatory statement for the applicability of the
Guidance of the EFSA Scientific Committee on
conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in
rodents on whole food/feed for GMO risk assessment**

EFSA Journal 2014;12(10):3871

- ❑ Chiarimenti sull'applicabilità della EFSA Scientific Committee Guidance (2011) nel contesto del Regolamento di Esecuzione (UE) 503/2013.
- ❑ Scenario 1: c'è una ipotesi sostenibile, le analisi già effettuate hanno identificato uno specifico pericolo.
- ❑ Scenario 2: nessun cambiamento o possibile rischio identificato.
- ❑ Ulteriore caratterizzazione del materiale da testare e diete.
- ❑ Possibilità di testare una sola dose (livello) come opzione dello scenario 2.

Dr. Anna Lanzoni (EFSA GMO Unit) and Claudia Paoletti (Deputy Head EFSA GMO Unit)