

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOTÓXICO DO
HERBICIDA DIURON: ESTUDO DE TOXICIDADE DE 28 E 90
DIAS (DOSES REPETIDAS)**

ALEXANDRE DOMINGUES

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista - UNESP para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU, SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOTÓXICO DO
HERBICIDA DIURON: ESTUDO DE TOXICIDADE DE 28 E 90
DIAS (DOSES REPETIDAS)

Mestrando: Alexandre Domingues

Orientadora: Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan

Co-Orientador: Luís Fernando Barbisan

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista - UNESP para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU, SP

2007

Dedicatória

À minha família, pela constante fonte de inspiração, força e dignidade.

Aos meus pais, Adalberto Domingues e Dalva Pâmio Domingues, por me fornecer todo apoio para que chegasse a este momento.

À minha irmã, Paula Renata Domingues, por sempre acreditar, mesmo quando eu cheguei a duvidar.

Aos amigos Douglas e Ellen, pelo exemplo de força e determinação.

Agradecimentos especiais

À Dra. Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan e ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, meus orientadores e amigos, pela confiança e apoio necessários para o início de meu amadurecimento científico. Mais do que qualquer ensinamento técnico, agradeço pelo exemplo de profissionalismo e dignidade que me passaram, e por me mostrar a importância de valorizarmos as coisas fundamentais da vida, devendo seguir cada passo nosso, esteja onde estivermos.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo pelo apoio e lições de profissionalismo, uma constante inspiração. Por possibilitar o uso do laboratório Toxicam, seu parque de equipamentos e serviços técnicos.

À Profa. Dra. Rosa Marlene Viero, por apoiar e acreditar na linha de pesquisa proposta para meu Doutorado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

À Prof. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, por sempre ter uma palavra de apoio em todos os momentos do meu mestrado. Pelo exemplo de empenho e amor à vida acadêmico-científica.

Aos amigos Paulo César Georgete (PC) e Glória Aparecida Rodrigues, por cuidar dos nossos animais e todo o auxílio durante o período no biotério. Profissionais sem os quais nossos experimentos se tornariam muito mais árduos.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Domingues, uma das grandes incentivadoras nesse início da minha vida científica.

À Tânia Alice Andrade, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, pelo apoio durante todo o processo do mestrado.

Aos amigos Alysson, Rafael, Milton, Ibraim, Fabiana, Guilherme, Daniel, PH, Vinicius e Fernanda, companheiros de uma vida que ajudaram a diminuir o peso de alguns desafios. Celebraremos juntos nossas vitórias, sempre.

À Daniela, pelo companheirismo, apoio, risadas, desaforos e por me entender sem a necessidade de grandes explicações.

Aos companheiros do laboratório Toxicam Meire, Carla, Mariana, João Paulo, João, Marize, Juliana, Rodrigo, Shádia, Kelly, Renato, Priscila, Elaine, Bruno, Cristina, Glenda e Paula, pelo convívio em nosso ambiente de trabalho.

Às amigas Carla, Meire e Shádia, por suportarem meu “stress” e surtos de mau-humor em algumas fases do meu mestrado.

Aos funcionários Paulo e Mara, pelo apoio no preparo do material para análise histológica. Como agradecimento o Paulo aprendeu tocar algumas notas de violão, agora é com você.

Aos funcionários do Hemocentro, pelo auxílio na utilização do citômetro de fluxo. Marjorie e Valéria, pela amizade e trabalho árduo.

Às amigas Priscila, Graziela, Carolina e Lindsey pelo apoio durante a fase do projeto realizado no Departamento de Imunologia do IBB.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Patologia, Dra. Denise Fecchio. Pela amizade e apoio em momentos cruciais.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, pela convivência e apoio durante esse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio ao projeto por meio da bolsa mestrado e reserva técnica.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu a realização do projeto.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram durante o desenvolvimento do meu mestrado.

Índice

Índice Geral

Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	iv

Capítulo I

1. Revisão da Literatura.....	1
1.1. Praguicidas: Considerações gerais.....	1
1.2. Diuron: Propriedades físico-químicas.....	2
1.3. Diuron: Propriedades biológicas e potencial tóxico.....	3
1.4. Imunotoxicidade de xenobióticos.....	6
2. Referências Bibliográficas.....	12
3. Objetivos.....	21.

Capítulo II

Artigo

Avaliação do potencial imunotóxico do herbicida Diuron em ratos
Wistar machos: estudo de toxicidade de 28 e 90 dias (doses repetidas)

Resumo.....	22
Abstract.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Animais e ambiente de experimentação.....	26
2.2. Preparo da ração com Diuron.....	26
2.3. Protocolo Experimental.....	26

2.4. Análise hematológica.....	27
2.5. Dosagens bioquímicas.....	27
2.6. Coleta de órgãos e processamento de tecidos.....	27
2.7. Preparo das células do baço.....	30
2.8. Marcação das células para análise fenotípica.....	31
2.9. Análise estatística.....	32.
3. Resultados.....	33
3.1. Peso corpóreo, consumo de ração e água e peso de órgãos.....	33
3.2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	34
3.3. Análise histológica.....	38
3.4. Análise fenotípica das subpopulações de linfócitos.....	43
4. Discussão.....	44
5. Referências.....	49

Capítulo III

Artigo

Avaliação do potencial imunotóxico do herbicida Diuron sobre a atividade de macrófagos peritoneais em ratos Wistar machos

Resumo.....	53
Abstract.....	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos.....	57
2.1. Animais e ambiente de experimentação.....	57
2.2. Preparo e administração de Onco-BCG.....	57
2.3. Preparo da ração com Diuron.....	57
2.4. Protocolo experimental.....	58
2.5. Obtenção das suspensões celulares.....	59
2.6. Espriamento e fagocitose.....	59
2.7. Determinação da liberação de H ₂ O ₂	60
2.8. Determinação da liberação de óxido nítrico.....	60
2.9. Análise Estatística.....	61
3. Resultados.....	62

4. Discussão.....	66
5. Referências.....	69

Índice de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1 - Critérios para análise histopatológica de órgãos linfohematopoiéticos.....	30
Tabela 2 - Peso corpóreo inicial, final e ganho de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.....	34
Tabela 3 - Consumo médio estimado de ração basal e de Diuron pelos animais controles e tratados com o herbicida por 28 e 90 dias.....	35
Tabela 4 - Peso relativo do fígado, rins, adrenais, baço e timo de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.....	36
Tabela 5 – Análise quantitativa dos esfregaços sanguíneos de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.....	37
Tabela 6 - Parâmetros bioquímicos de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.	38
Tabela 7 - Alterações histológicas no baço de ratos Wistar machos expostos ao Diuron por 28 e 90 dias.....	41
Tabela 8 - Histologia de medula óssea de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.....	42
Tabela 9 - Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos B CD45RA ⁺ no baço de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.....	43

Capítulo III

Tabela 10 - Peso corpóreo inicial, final e ganho de animais controles e tratados com Diuron por 14 dias.....	66
---	-----------

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1 - Estrutura molecular do herbicida Diuron.....	3
--	---

Capítulo II

Figura 2 - Protocolo Experimental.....	29
---	----

Figura 3 - Esplenomegalia: Comparação entre baços de grupos controle e tratados aos 28 e 90 dias.....	44
--	----

Figura 4 – Suspensões celulares obtidas a partir do baço: Diferenças de pigmentação entre baços de grupos controle e tratados aos 28 e 90 dias.....	44
--	----

Figura 5 - Histologia dos baços de animais dos grupos controle e tratados: Redução de polpa branca e aumento da deposição de hemossiderina.....	44
--	----

Capítulo III

Figura 6 – Protocolo Experimental.....	58
---	----

Figura 7 - Espriamento de macrófagos peritoneais nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG.....	62
---	----

Figura 8 - Avaliação do índice de fagocitose nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG.....	63
---	----

Figuro 9 - Produção de água oxigenada nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG.....	64
--	----

Figura 10 -. Produção de óxido nítrico nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG.....	65
---	----

Revisão de Literatura

1. Revisão da literatura

1.1 Praguicidas: Considerações gerais

Os praguicidas são substâncias químicas utilizadas no combate as pragas das lavouras e áreas urbanas, sendo que nesta designação enquadram-se as classes: inseticidas - que eliminam insetos; acaricidas – que eliminam ácaros ou carrapatos; fungicidas – que eliminam fungos parasitas; herbicidas – que combatem ervas daninhas, e raticidas - que eliminam pequenos roedores (Soares, 1993). A utilização de agentes químicos como praguicidas vem desde a antiguidade, contudo seu uso se ampliou consideravelmente durante o século XX com o desenvolvimento da síntese química, ou seja, o desenvolvimento de moléculas específicas para um propósito (IARC, 1991).

Diversas substâncias químicas utilizadas na agricultura são reconhecidas como possíveis agentes tóxicos, teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (Feber & Cabral, 1991; IARC, 1991). Apesar de terem como alvo específico algumas pragas, efeitos adversos em seres humanos e outras espécies ainda não foram devidamente caracterizados (Weiss, 2004). A determinação e a extensão de doenças relacionadas à exposição ambiental é difícil de ser calculada. Os riscos potenciais para a saúde humana associados com a exposição à misturas químicas torna-se uma preocupação crescente (Carpenter, 2002).

A exposição aos praguicidas não ocorre somente em trabalhadores rurais, que manipulam diretamente esses compostos através de exposição ocupacional, mas também na população em geral, através de exposição acidental com resíduos, ingestão de água e alimentos contaminados. Enquanto a exposição ocupacional afeta um grupo limitado de trabalhadores, numa faixa de partes por milhão (ppm), as exposições

acidentais, através da água, ar, alimentos e locais de despejo, podem estar na faixa de partes por bilhão (ppb). Os efeitos de exposições crônicas em baixos níveis sobre a saúde humana ainda são pouco conhecidos (Levy, 2000).

A avaliação da periculosidade dos praguicidas e a caracterização adequada do potencial toxicológico podem fornecer informações valiosas para o implemento de medidas governamentais e de saúde pública que regularizem seu uso segundo níveis adequados de exposição humana (Morrison et al., 1992; Weisenburger, 1993). As deficiências na avaliação de risco de praguicidas, incluindo a padronização de metodologias para tal finalidade, apontam a necessidade do desenvolvimento de programas para a avaliação da periculosidade dessas substâncias e do implemento de alternativas ao seu uso (Feldman, 2004).

1.2 Diuron: Propriedades físico-químicas

O Diuron, 3(3,4-diclorofenil) 1,1, dimetil uréia (Figura 1), é um praguicida da classe feniluréia (derivado dihalogenado da uréia) amplamente utilizado em culturas agrícolas como cana-de-açúcar, café, citros, soja e alfafa (Figura 1). Sua classificação toxicológica se enquadra nos níveis II a IV (altamente a moderadamente tóxico) e a ambiental no nível II (produto muito perigoso), (CD do Sistema de Informações Toxicológicas Sobre Agrotóxicos - Agência de Vigilância Sanitária, Brasil, 2000). Em microorganismos e em plantas daninhas atua inibindo a fotossíntese, prevenindo a produção de oxigênio e a transferência de elétrons na etapa II da fotossíntese (Wessels et al, 1956). Quanto às suas características, em sua forma pura, o Diuron é um cristal, não-iônico, com moderada solubilidade em água (42 mg/L a 20°C). Apresenta hidrólise desprezível em pH neutro, aumentando, contudo, em condições mais ácidas ou básicas (Salvestrini, 2002; Giacomazzi & Cochet, 2004). Devido a sua elevada persistência (um mês a um ano), o Diuron pode ser uma fonte potencial de contaminação do solo, sedimentos e ambientes aquáticos (Field et al, 2003).

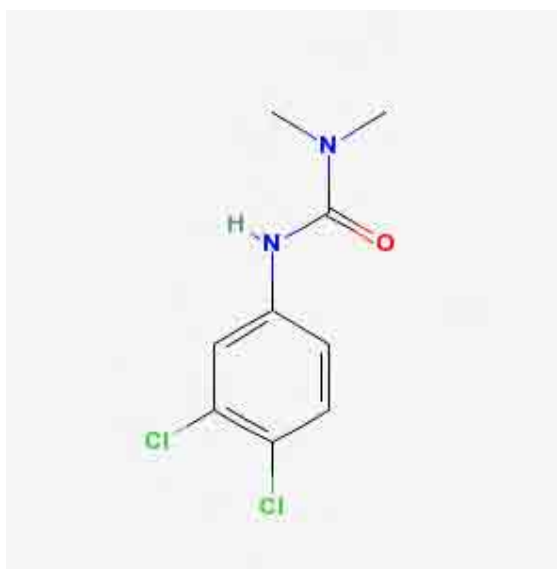


Fig. 1 – Estrutura molecular do Diuron 3(3,4-diclorofenil) 1,1, dimetil uréia

É importante salientar que os praguicidas, ao sofrerem degradação ambiental, podem dar origem a compostos intermediários mais tóxicos do que o composto original. As substâncias da classe N-feniluréia, por exemplo, são degradadas no solo a derivados como 3,4-dicloroanilina (Goody et al, 2002) e, particularmente, herbicidas como o Diuron (feniluréia halogenados), ao serem expostos a radiação ultravioleta, podem sofrer fotólise, gerando pelo menos um subproduto com toxicidade mais elevada do que o composto original (Bonnemoy, 2003). Esta característica é particularmente importante em países tropicais, onde os níveis de radiação ultravioleta são elevados durante o ano inteiro. Além disso, durante sua produção são gerados contaminantes, potentes substâncias “dioxina-like” que podem interferir no potencial de toxicidade do Diuron. Devido a este fato, a Autoridade de Registro Nacional Australiana (NRA, sigla do inglês), está revendo a classificação e registro do Diuron segundo a toxicidade destes compostos (NRA, 2002).

1.3 Diuron: Propriedades biológicas e potencial tóxico

O Diuron é absorvido no trato gastrointestinal e sistema respiratório. Em seres humanos, é metabolizado pelo fígado por hidroxilação e N-dealquilação, sendo excretado pela urina. Em ratos e cães foi observada excreção também pelas fezes (Hayes, 1982). Atua como indutor enzimático do sistema de oxidases mistas (enzimas

do citocromo P450), aumentando o conteúdo enzimático do sistema em aproximadamente 50%, quando comparado a praguicidas similares (Schoket & Vincze, 1985). É tóxico para mamíferos, contudo os jovens são mais susceptíveis que os adultos (Hayes, 1982). Em roedores, os herbicidas derivados de uréia apresentam baixa toxicidade sistêmica, com uma dose letal média (DL50) de 1017 mg/kg em ratos jovens normais, 437 mg/kg em ratos tratados com dieta deficiente em proteínas e de 2390 mg/kg em ratos tratados com dieta rica em proteínas (Boyd & Krupta, 1970). Apesar desta baixa toxicidade aguda, é de extrema importância ressaltar que seus produtos intermediários de degradação (metabólitos e fotoprodutos) podem ser mais tóxicos do que o herbicida em sua forma original. Por exemplo, a biotransformação do Diuron pela *Arthrobacter sp.*, N₂ ou outros microorganismos gera metabólitos de elevada toxicidade (Tixier et al, 2002).

O principal produto de degradação do Diuron, a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), apresenta DL50 de 60mg/kg por via inalatória, indicando que esse subproduto é mais tóxico do que o próprio praguicida. A absorção por via dérmica ou inalatória deste componente leva à rápida formação de metahemoglobina, causando hipóxia e levando à sensibilização respiratória (Guilhermino, 1998). O potencial cancerígeno da 3,4-DCA ainda não está devidamente estabelecido.

Experimentos realizados com ratos Wistar e cães Beagle, expostos ao Diuron em estudo de toxicidade oral, permitiram detectar a presença de resíduos do herbicida em diferentes tecidos, sendo os maiores níveis encontrados nos rins e fígado (Hodge et al., 1967). Efeitos tóxicos, geralmente observados após a ingestão crônica foram perda de peso, alterações em fígado, baço e distúrbios hematológicos (Hayes, 1982). Nestes estudos, na concentração de 250 ppm (dose de 6,26 mg/kg em cães e 12,5 mg/kg em ratos), foram observadas alterações hematológicas, perda de peso, hemossiderose no fígado e hiperplasia da série eritróide. Não foram observadas evidências de carcinogenicidade do Diuron. Estudos associando o Diuron ao hexaclorociclohexano (HCH), um inseticida descrito como hepatocancerígeno, demonstraram alta mortalidade e perda de peso em ratos machos albinos expostos às concentrações de 2500 ppm e 500 ppm, respectivamente, na ração (Nagasaki et al, 1971; Munir et al, 1983). Em modelos experimentais, a exposição ao Diuron demonstrou causar irritações oculares e na mucosa de coelhos (Worthing, 1993).

A avaliação do potencial mutagênico do Diuron ainda não está devidamente caracterizada, mostrando-se negativo na maioria dos estudos *in vitro* utilizando microorganismos, com ou sem ativação metabólica (Grutman et al., 1984). Entretanto, mutagenicidade positiva foi relatada em testes com *Salmonella typhimurium* com ativação metabólica e ensaios de biossíntese de DNA testicular (Seiler, 1978; Anon, 1987). Dois testes *in vitro* utilizando células de mamíferos, o de mutação gênica em células de ovário de hamster chinês e o de síntese não-programada de DNA (UDS, sigla do inglês) em hepatócitos de ratos, obtiveram resultados negativos para o praguicida (Dupont de Nemours, 1985). Avaliações *in vivo* de efeitos resultantes da exposição ao herbicida, demonstraram indução da formação de micronúcleo em medula óssea de camundongos Swiss (Agrawal et al., 1996), mutações dominantes letais em camundongos Swiss (Agrawal & Mehrotra, 1997) e efeitos clastogênicos em ratos (Dupont de Nemours, 1985). Nascimento et al. (2006) não observaram efeitos genotóxicos do Diuron em células do sangue periférico e da bexiga de ratos Wistar machos através do teste do cometa, não inferindo potencial iniciador ao herbicida.

Diversas drogas e substâncias químicas estão relacionadas com teratogênese, ocasionando anomalias congênitas (defeitos morfológicos) com incapacidade funcional e estética graves, e fetotoxicidade, caracterizada por redução do peso corpóreo e retardo do desenvolvimento fetal (Finell, 2002). Estudos sobre os efeitos do Diuron sobre a gestação e a capacidade reprodutiva, utilizando três gerações consecutivas de ratos, demonstraram que a ingestão do herbicida na dose de 6 mg/kg foi fetotóxica, causando redução do peso corpóreo nas proles F2 e F3 (segunda e terceira geração). Em doses diárias de 250 mg/kg de peso corpóreo, não houve evidência de potencial teratogênico, contudo, fetotoxicidade foi relatada, caracterizando-se por pesos fetais diminuídos, costelas e estrutura óssea menores. Tais efeitos também foram observados em doses de 125 mg/kg, contudo sua incidência não foi significativa (Khera et al., 1979; EPA, 1987).

Até o momento, poucos trabalhos na literatura voltam-se para o estudo do potencial cancerígeno do Diuron e os dados ainda se mostram contraditórios. Antony e colaboradores (1989) demonstraram, através de múltiplas aplicações tópicas (250 mg/kg pc), que o Diuron é um agente iniciador da carcinogênese de pele em camundongos Swiss, utilizando-se como agente promotor o 12-O-tetradecanoil phorbol 13-acetato (TPA). Já em modelo de carcinogênese hepática, quando administrado na dieta (2500 ppm) por um período de 4 ou 8 meses, o Diuron não revelou atividade iniciadora ou

promotora (Agrawal & Kumar, 1999). Somando essas informações ao já citado estudo de Nascimento et al (2006 os dados revelam um conflito entre o potencial iniciador para a pele em camundongos e ausência de potencial genotóxico do Diuron.

Em outro estudo, Grassi et al. (2005) demonstraram que o Diuron, administrado na dieta nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, não apresenta atividade promotora no fígado de ratos Wistar machos iniciados pela dietilnitrosamina. Em estudo cujo alvo de análise foi o sistema urinário, concentrações de 2500 ppm de Diuron relacionaram-se com aumento de necrose e estímulo da proliferação celular, levando à hiperplasia urotelial em ratos Wistar machos (Nascimento et al., 2006). Em ratos Wistar de ambos os gêneros, os quais receberam por dois anos na ração 2500 ppm de Diuron, foi observado aumento da incidência de papilomas e carcinomas de bexiga; os ratos machos apresentaram tendência ao desenvolvimento de papilomas e carcinomas na pelve renal (Bayer, 1985 *apud* USEPA, 1997). Dois tumores renais, considerados raros na espécie, foram observados em ratos Wistar machos expostos a altas concentrações do Diuron. Contudo, esses estudos não estão disponíveis, pois são propriedades industriais (Anon, 1987). Fêmeas de camundongos da linhagem NMR1 expostas à concentração de 2500 ppm de Diuron apresentaram tendência ao aumento de adenocarcinomas mamários. Este achado foi considerado maior que a incidência de dados históricos para este tipo de tumor em fêmeas controles de estudos com a mesma linhagem de camundongos (Iyer, 2001). Assim, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) está reavaliando o potencial de carcinogenicidade do Diuron devido a resultados positivos observados em estudo de longa-duração em roedores.

1.4 Imunotoxicidade de xenobióticos

Contaminantes ambientais, incluindo bifenis policlorados (PCBs), dioxinas, metais pesados e praguicidas como dieldrin e DDT (diclorodifeniltricloroetano) estão amplamente distribuídos em ambientes aquáticos e terrestres (Boffetta, 2006). A persistência desses compostos, sua bioacumulação nos organismos vivos e seu potencial em causar efeitos adversos, incluindo efeitos sobre o sistema imunológico, geram preocupação às instituições governamentais e ao público em geral (Gaylor et al., 1997).

Historicamente, a maior preocupação com relação aos possíveis efeitos adversos de agentes químicos voltava-se principalmente para o estudo de seu potencial cancerígeno. Contudo, pesquisadores passaram a reconhecer a importância de eventos adversos não-carcinogênicos, tais como imunotoxicidade e teratogênese, no perfil tóxico de substâncias as quais a população está exposta (Dean, 2004). Neste sentido, a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA, sigla do inglês) desenvolveu um Guia (Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.7800 Immunotoxicity) para testar praguicidas e substâncias tóxicas em roedores, com ênfase sobre parâmetros imunológicos, cuja proposta é melhorar as informações sobre a supressão do sistema imunológico que pode ocorrer como resultado da exposição repetida a um determinado xenobiótico (EPA, 1998). Da mesma forma, o Guia para estudo de toxicidade oral de 90 dias em roedores da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, sigla do inglês) acrescentou um adendo com ênfase em parâmetros imunológicos (OECD 408, 1998).

O conhecimento dos efeitos adversos decorrentes da interação entre xenobióticos e componentes do sistema imunológico é o principal foco da Imunotoxicologia (Luster & Rosenthal, 1993). Estes efeitos indesejados podem resultar da ação direta e/ou indireta do xenobiótico (e/ou produtos de sua biotransformação) sobre o sistema imunológico; de uma resposta imunológica do hospedeiro à substância e/ou seus metabólitos ou de modificações dos antígenos do hospedeiro pelos próprios compostos ou seus metabólitos (Bennett, 1987;). O resultado da ação tóxica dos xenobióticos sobre o sistema imunológico pode levar à disfunção imunológica do hospedeiro facilitando o aparecimento de doenças auto-imunes e reações de hipersensibilidade, bem como, a susceptibilidade aumentada ao aparecimento de infecções oportunistas, e ao desenvolvimento de neoplasias (Descotes et al., 2000; Kimber & Dearman, 2002).

O campo da imunotoxicologia vem crescendo consideravelmente desde a década de 70 (Descotes, 2004). Os caminhos atuais seguidos por essa ciência abrangem experimentos de avaliação de toxicidade em roedores, sob condições controladas de exposição, na tentativa de mimetizar situações as quais os seres humanos estão expostos (Vohr, 2000). Dados de estudos animais têm sido muito úteis para prever o potencial

de imunotoxicidade e seus efeitos sobre a resistência do hospedeiro. Além disso, os resultados de estudos experimentais estão sendo aplicados em modelos de paralelogramas para reduzir as incertezas associadas a níveis de organização biológica cruzada, e extrapolação de dados animais para o homem (Selgrade, 1999). Os resultados experimentais também auxiliam no discernimento com relação à variabilidade intra-espécie e a relação entre os efeitos decorrentes de exposição, aguda, sub-aguda e crônica. Em última instância estes achados podem auxiliar na decisão sobre o risco da substância para a população humana (Selgrade, 1999).

Apesar de diversos sistemas orgânicos serem afetados por contaminantes ambientais, dados resultantes de modelos experimentais indicam que o sistema imunológico é um dos alvos mais sensíveis para a toxicidade induzida por agentes químicos. A disfunção imunológica pode ser observada, em estudos toxicológicos, em roedores submetidos à doses sub-letais de vários agentes químicos ambientais (Luster & Rosenthal, 1993; Colosio et al., 2005). A atrazina, um herbicida considerado de baixa toxicidade, alterou parâmetros de função imunológica mediada por células e reduziu a resistência do hospedeiro, ao desafio com células de melanoma B16F10, em estudo com camundongos B6C3F1, tratados por 14 dias (Karrow et al., 2005). Um estudo realizado com camundongos CBA/N mostrou que a N,N-dietilanilina inibiu a atividade das células “natural killer” (NK) e dos linfócitos T citotóxicos sem alterar o número destas células (Li et al., 2000). Um estudo *in vitro* utilizando-se células mononucleares de sangue periférico humano de doadores normais mostrou que o Diuron, administrado às culturas nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM, inibiu a produção de IL-5, IFN- γ e TNF- α (Hooghe et al., 2000). Ratas expostas às doses de 250-1000 mg/kg de Diuron na dieta por 14 meses apresentaram aumento do peso do baço, aumento de hemosiderina e formação de aductos de aminas aromáticas liberadas do herbicida na molécula de hemoglobina (Wang et al., 1993). Algumas substâncias, como selênio, dietilnitrosamina, dióxido clorina e monocloramina, afetam a atividade e a produção de citocinas pelos macrófagos (Koller, 1985). Os hidrocarbonetos aromáticos halogenados provocam alterações no epitélio tímico, na diferenciação de células B e T (Poland & Knutson, 1982; Greenlee et al.,

1985; Luster et al., 1988). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos provocam alterações em células T auxiliares, na função de macrófagos e inibem a blastogênese (Wojdani & Alfred, 1984). Fêmeas Balb/c expostas ao 3-monocloro-1,2-propanodiol por 14 dias, apresentaram redução da celularidade do timo e do baço, inibição da resposta imunológica mediada por anticorpos contra hemáceas de carneiro e diminuição da atividade NK na maior dose (100 mg/Kg) (Lee et al., 2004). Indivíduos expostos ao asbestos podem apresentar alterações em número e função de macrófagos e diminuição da atividade NK em células circulantes (Rosenthal, 1998).

A dinâmica do sistema imunológico, caracterizada pela proliferação e diferenciação celular, amplificação, transcrição e tradução gênica, faz dele um importante alvo dos efeitos tóxicos de xenobióticos (Vial, 2002). Dentre os diferentes órgãos que constituem o sistema imunológico, o timo e a medula óssea, responsáveis pelos processos de maturação e diferenciação dos componentes do sistema imunológico, são órgãos centrais para avaliação de imunotoxicidade (Schuurman, 1994). Os efeitos adversos decorrentes da interação de xenobióticos com componentes do sistema imunológico geralmente incluem danos estruturais e/ou funcionais em órgãos linfóides tais como, alteração da celularidade do timo, baço, medula óssea e linfonodos, proliferação anormal de progenitores na medula óssea, alteração no processo de maturação das células imunológicas e alterações funcionais das respostas humoral e/ou celular (Descotes, 1988; Kimber & Dearman, 2002). Essa diversidade de efeitos resultantes da exposição à agentes químicos, e a possibilidade do desenvolvimento de eventos adversos tardios, faz da avaliação do potencial imunotóxico de xenobióticos uma ciência de grande complexidade e revela a necessidade de cautela na interpretação de dados (Kimber & Dearman, 1993; Descotes, 2000).

A avaliação toxicológica de um composto é acessada por meio de estudos de doses repetidas, cuja exposição fica em torno de 4 semanas a 3 meses, utilizando-se 3 doses que variam de superdosagem (exercendo toxicidade, mas não mortalidade) a efeitos adversos não observados - baixas doses (Dean et al., 1989; Barlow et al., 2002). Estudos de doses repetidas em imunotoxicologia estão tradicionalmente relacionados aos efeitos de um determinado composto sobre a imunidade celular, com a possível

adição de grupos satélites para avaliação de funções da imunidade humoral (Barlow et al., 2002).

Em função da complexidade do sistema imunológico, diversos biomarcadores de toxicidade devem ser avaliados para caracterização do potencial imunotóxico de uma substância. Para tal, um painel de testes que abrange a análise histológica de órgãos linfóides e estudos de função imunológica, como testes de resistência do hospedeiro e produção de citocinas têm sido proposto (Luster et al., 1988; Vandebriel, 1998; Schuurman, 1994; Kuper et al., 2000). O primeiro painel abrange testes não-funcionais onde se enquadram as avaliações de peso corpóreo, peso e histopatologia de órgãos linfohematopoiéticos, e hematologia. O segundo painel inclui os testes funcionais, tais como atividade de macrófagos, atividade NK, marcadores de superfície, resposta proliferativa, ensaios de citotoxicidade, produção de anticorpos e modelos de resistência do hospedeiro (Luster et al., 1988). Dentre esses testes, a observação de achados histopatológicos em órgãos linfóides primários e secundários é uma ferramenta indispensável na caracterização da toxicidade de compostos sobre o sistema imunológico (Germolec, 2004; Kuper, 2006). O desenvolvimento das técnicas histológicas e a associação destas com testes funcionais, cultura de células e tecidos, permitem uma melhor compreensão dos mecanismos de imunotoxicidade (Schuurman, 1994). Com o avanço da imunologia molecular os estudos de modo e mecanismo de ação estão se tornando mais práticos. E, com isso, a indústria e agências de regulamentação de substâncias estão propondo o uso de técnicas de expressão gênica para identificar e classificar o potencial imunotóxico de substâncias. Além disso, diversos estudos de imunotoxicidade publicados sugerem que a análise por “microarray” é uma prática significativa para explorar as vias que levam a disfunção imunológica (Luebke et al., 2006).

Além dos tradicionais métodos utilizados *in vivo*, para avaliação do potencial imunotóxico, métodos alternativos têm sido propostos no sentido de se reduzir o número de animais de experimentação na implementação do registro de novos químicos. Um estudo preliminar realizado por Carfi e colaboradores (2006), avaliou o potencial imunotóxico de seis substâncias, com conhecidos efeitos imunotóxicos *in vivo*, utilizando um conjunto de testes *in vitro*. Os testes propostos foram ensaios de citotoxicidade, liberação de citocinas, mielotoxicidade e resposta mitogênica. Todos

eles confirmaram os resultados *in vivo* do potencial imunotóxico das substâncias estudadas.

Referências

Referências

1. Agrawal RC, Mehrotra NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Indian J. Exp. Biol.* 1997; 35:1256.
2. Agrawal RC, Kumar S. Hepato-toxic effect of Diuron in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37:503-4.
3. Agrawal RC, Kumar S, Mehrotra, NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Toxicol. Letters.* 1996; 86: 1
4. Anon D. *Proper. Ind. Mater. Report.* 1987; 7 : 49.
5. Antony M, Shukla Y, Mehrotra, NK. Tumour initiatory activity of an herbicide Diuron on mouse skin. *Cancer Lett.* 1989; 48:125-8
6. Barlow SM. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol.* 2002 ;40(2-3):145-91
7. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with NMRL mice (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology. 1983 (DPR # 106-048).
8. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology. 1985 (DPR # 106-035).
9. Bennett E, Mercier M. Preface in *Immunotoxicology.* Boston:Martinus Nijhoff Publishers, 1987.
10. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res.* 2006;608(2):157-62.
11. Bonnemoy F, Lavedrine B, Boulkamh A. Influence of UV irradiation on the toxicity of phenylurea herbicides using Microtox test. *Chemosphere.* 2004;54(8):1183-7.

12. Boyd EM, Krupta V. Protein deficiency diet and Diuron toxicity. *J Agric Food Chem.* 1970; 18:1104-1107.
13. Carfi M. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology.* 2007 ;229(1-2):11-22
14. Carpenter DO, et al. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ Health Perspect.* 2002; 110 (suppl A):25.
14. Colosio C, Birindelli S, Corsini E, Galli CL, Maroni M. Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;207(2):320-328.
15. Dean JH, Cornacoff JB, Rosenthal GJ, Luster MI. Immune system: Evaluation of injury. *Principles and Methods of Toxicology* .A. W. Hayes, Ed. 1989, p 741-760. Raven Pres, New York
16. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G, Van Ganse E, Vial T. Responses of the immune system to injury. *Toxicol. Pathol.* 2000, 28:479-481.
17. Descotes J. Immunotoxicity of chemicals. In: *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals.* Amsterdam:Elsevier. 1988;297-444.
18. Descotes J. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective (Review). *Toxicol Lett.* 2004 ;149(1-3):103-8.
19. Descotes J. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Drug Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(2):249-59.
20. Descotes J. Regulating immunotoxicity evaluation: issues and needs. *Arch Toxicol Suppl.* 1998;20:293-9
21. Dupont de Nemours & CO. Mutagenicity studies with Diuron. *Salmonella* test, No. HLR 471-84 (7185); CHO/HGPRT forward gene mutation assay, H.R. No. 282-85 (06/28/85); unscheduled DNA synthesis test in primary rat hepatocytes, HLR No. 349-85; and *in vivo* cytogenetic test, No. 36685

-
22. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Health effects test guidelines: OPPTS 870.7800 Immunotoxicity. 1996.
 23. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Increased incidence of malignant and combined malignant and benign tumors in male and female rats and increased incidence of malignant tumors in female mice. 1987
 24. Feber A, Cabral R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Additives Contam.* 1991; 8:755-776.
 25. Feldman J. Risk assessment, a community perspective. *Pesticides Pediatrics*, 2004;113:1030-1036.
 26. Fernandes GS, et al. Reproductive effects in male rats exposed to Diuron. *Reprod Toxicol.* 2007;23(1):106-12.
 27. Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Griffith SM, Wignington PJ Jr. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J Environ Qual.* 2003; 32(1):171-9
 28. Finell, RH et al. Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42:181
 29. Gaylor DW et al. Health risk assessment practices in the U.S. Food and Drug Administration. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1997; 26(3):307-321.
 30. Germolec DR, et al. The accuracy of extended histopathology to detect immunotoxic chemicals. *Toxicol Sci.* 2004; 82(2):504-14.
 31. Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of Diuron transformation: a review. *Chemosphere.* 2004; 56(11): 1021-32.
 32. Goody DC, Chilton PJ, Harrison I. A field study to assess the degradation and transport of Diuron and its metabolites in a calcareous soil. *Sci Total Environ.* 2002 ;297(1-3):67-83

-
33. Grassi, T. Avaliação da carcinogenicidade do pesticida Diuron em modelo de carcinogênese de média duração para o fígado de ratos Wistar machos. Tese de Mestrado. 2006
 34. Greenlee WF, Osborne R, Dold KM, Hudson LG, Toscano WA Jr. Toxicity of chlorinated aromatic compounds in animals and humans: in vitro approaches to toxic mechanisms and risk assessment. *Environ Health Perspect.* 1985;60:69-76.
 35. Grutman G, Schoofs L, Lontie JF, Van Larebeke N. The mutagenicity in prokaryotes of herbicides. 1984; *Residue Rev.* 91,1
 36. Guilhermino L, Soares AM, Carvalho AP, Lopes MC. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on blood of male Wistar rats. *Chemosphere.* 1998;37(4):619-32.
 37. Hayes WJ Jr. Pesticides studied in man. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1982; p. 672.
 38. Hodge HC, Downs WL, Panner B, Smith D, Maynard E, Clayton J Jr, Rhodes R. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 1967; 5: 513.
 39. Hodgson E. Introduction to toxicology. In Hodgson E, Levi PE (eds). *Textbook of modern toxicology.* Stamford, CT, Appleton & Lange, 1997, p1-25
 40. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe EL Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences.* 2000; 66:2519-2525.
 41. International Agency for Research on Cancer (IARC). WHO International Life Sciences Institute. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1991;53:612.
 42. Iyer P. Developmental and Reproductive Toxicology of Pesticides. In Krieger R, *Handbook of Pesticide Toxicology* 2nd Edition, VI Academic Press, San Diego.

-
43. Karrow NA. Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology*. 2005;209(1):15-28.
 44. Khera .S, Whalen C, Trivett G, Ongers G. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 1979; 22: 522.
 45. Kimber I, Dearman RJ. Immune response: adverse versus non-adverse effects. *Toxicol. Pathol*. 2002; 30:54-58
 46. Kimber I, Dearman RJ. Approaches to the identification and classification of chemical allergens in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993;29(1):11-6
 47. Koller LD. Effect of chemical sensitivity on the immune system. *Immunol Allergy Pract*. 2002; 13-25.
 48. Kuper CF, Harleman JH, Richtr-Reichelm HB, Vos JG. Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity: Review. *Toxicol Pathol*. 2000; 28:454-66.
 49. Kuper FC. General aspects of immunotoxicology including validation issues. *Exp Toxicol Pathol*. 2006;57(5-6):363-6
 50. Lee JK, et al. Evaluation of the potential immunotoxicity of 3-monochloro-1,2-propanediol in Balb/c mice. I. Effect on antibody forming cell, mitogen-stimulated lymphocyte proliferation, splenic subset, and natural killer cell activity. *Toxicology*. 2004 ;204(1):1-11.
 51. Levy BS, Wegman DH. Occupational health – an overview. In Levy BS, et al: *Occupational health. Recognizing and preventing work-related disease and injury*, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkin, 2000. p 3-13

-
52. Li Q, Hirata Y, Piao S, Mami M. Immunotoxicity of N,N-diethylaniline in mice: effect on natural killer activity, cytotoxic T lymphocyte activity, lymphocyte proliferation response and cellular components of the spleen. *Toxicology*. 2000;150(1-3):179-89
 53. Luebke RW, et al. Immunotoxicogenomics: the potential of genomics technology in the immunotoxicity risk assessment process. *Toxicol Sci*. 2006;94(1):22-7
 54. Luster MI, et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1988;10(1):2-19
 55. Luster MI, Rosenthal GJ. Chemical agents and the immune response. *Environ. Health Perspect*. 1993; 100:219-236. Selective effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and corticosteroid on in vitro lymphocyte maturation. *J Immunol*. 1988 ;140(3):928-35.
 56. Morrison HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D. Herbicides and cancer. *J Natl. Cancer Inst*. 1992; 84: 1866-1874.
 57. Mumir KM, Soman CS, Bhide SV. Hexachlorocyclohexane-induced tumorigenicity in mice under different experimental conditions. *Tumori.*, 1983; 31;69(5):383-6.
 58. Nagasaki H, Tomii S, Mega T, Marugami M, Ito N. Development of hepatomas in mice treated with benzene hexachloride. *Gann.*, 1971;62(5):431
 59. Nascimento MG et al. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology*. 2006; 224: 6-73
 60. NRA. Diuron review scope document. Canberra, Australia. 2002. Disponível em: http://www.apvma.gov.au/chemrev/diuron_scope.pdf

-
61. Organization for Economic Cooperation AND Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 408: Subchronic Oral Toxicity-Rodent: 90-day Study, 1998.
 62. Organization for Economic Cooperation AND Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, 1995.
 63. Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons.: examination of the mechanism of toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1982; 517-554
 64. Roitt IM, Brostoff J, Male DK, eds. *Immunology*, 2nd ed. New York:Harper & Row Publishers, 1998.
 65. Rosenthal GJ, Corsini E, Simeonova P. Selected new developments in asbestos immunotoxicity. *Environ Health Perspect.* 1998;106 (1):159-69.
 66. Salvestrini S, Di Cerbo P, Capasso S. Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere*, 2002;48(1):69-73.
 67. Schoket B., Vincze I. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *Acta pharmacol. et toxicol.* 1985; 56:283-288.
 68. Schuurman HJ, Kuper CF, Vos JG. Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Review. Toxicology.* 1994, 7;86(3):187-212.
 69. Seiler J.P. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat. Res.* 1978; 58: 353.
 70. Selgrade MK. Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process. *Toxicology.* 1999; 133:59-72

-
71. Snodin DJ. Regulatory immunotoxicology: does the published evidence support mandatory nonclinical immune function screening in drug development? *Regul Toxicol Pharmacol.*, 2004;40(3):336-55.
 72. Soares JL. Dicionário etimológico e circunstanciado de Biologia. São Paulo: Scipione; 1993.
 73. Tixier C. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*, 2002;46(4):519-26.
 74. Vandebriel RJ, Van Loveren H, Meredith C. Altered cytokine (receptor) mRNA expression as a tool in immunotoxicology. *Toxicol.* 1998b; 130:43-67
 75. Vial T, Choquet-Kastylevsky G, Descotes J. Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system. Review. *Toxicology.* 2002; 174(1):3-11.
 76. Vohr HW, Ruhl-Fehlert C. Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. *Sci Total Environ.* 2001; 270(1-3):123-33.
 77. Wang SW, Chu C.Y, Wang C.J. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 1993; 31:285-295.
 78. Weisenburger D. Perspective in pathology: human health effects of agricultural use. *Hum Pathol.* 1993, 24: 571-576.
 79. Weiss B, Amler S, Amler RW. Pesticides. *Pediatrics.* 2004; 113(4):1030-6.
 80. Wessels JS, Van DER, Veen R. The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1, 1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochim Biophys Acta.*, 1956;19(3):548-9.

81. Wojdani A, Attarzadeh M, Wolde-Tsadik G, Alfred LJ. Immunocytotoxicity effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on mouse lymphocytes. *Toxicology*. 1984;31(3-4):181-9.
82. Worthing C S. *The pesticide manual*, British Crop Protection Council. Lavenhem Press, Suffolk. 1993; 339.

Objetivo

3. Objetivo

Considerando a escassa Literatura sobre o potencial imunotóxico do Diuron e que vários praguicidas podem afetar o sistema imunológico levando a sua disfunção, o presente estudo foi dividido em dois trabalhos para avaliar o potencial imunotóxico desse herbicida:

1. Parâmetros toxicológicos, hematológicos, histologia dos órgãos linfohematopoiéticos e fenotipagem de linfócitos T CD4, CD8 e CD45, seguindo critérios estabelecidos pelo “Guideline” OECD 407 e 408 e “Guideline” OPPTS 870.7800 Immunotoxicity do EPA, foram avaliados em ratos Wistar machos;
2. A atividade de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos foi avaliada pela produção de água oxigenada, óxido nítrico, índice de fagocitose e espraiamento.

Artigo

Capítulo II

Avaliação do potencial imunotóxico do herbicida diuron: estudo de toxicidade de 28 e 90 dias (doses repetidas)

Alexandre Domingues¹, Maria Aparecida Domingues¹, João Lauro Viana de Camargo¹,
Luís Fernando Barbisan², Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan^{1*}

¹Departamento de Patologia, TOXICAM, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

Auxílio Financeiro

A realização deste estudo foi possível pelo Auxílio Financeiro da CAPES (Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) e pela Bolsa de Estudo FAPESP do Mestrando Alexandre Domingues (Proc: 05/01223-7).

¹Autor correspondente

Departamento de Patologia, TOXICAM, Faculdade de Medicina

UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

Fone: 55-0-XX-14-3811-6238 / Fax: 55-0-XX-14-3815-2348

e-mail:

anabarbi@fmb.unesp.br

Resumo

Escassas informações são encontradas na literatura a respeito do potencial imunotóxico do Diuron, um herbicida derivado da uréia, utilizado no Brasil e no mundo nas lavouras de café, cana-de-açúcar, algodão, abacaxi, citros, alfafa e trigo. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo investigar a toxicidade do Diuron sobre o sistema imunológico. Para isso, foram avaliados parâmetros gerais de toxicidade, bioquímicos, hematológicos, histopatologia de órgãos linfohematopoiéticos e fenotipagem de linfócitos T CD4, T CD8 e B de ratos Wistar machos. Foram utilizados dois protocolos experimentais: I - toxicidade aguda (28 dias) e II - toxicidade subcrônica (90 dias) sendo os animais expostos ao Diuron por via oral (adicionado à ração), nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm. A exposição ao Diuron resultou em diminuição do ganho de peso corpóreo médio nos grupos 1250 e 2500 ppm aos 28 e 90 dias acompanhada pela redução do consumo de ração. O peso relativo do baço e dos rins foi maior nas três concentrações de Diuron aos 28 dias, e apenas em 2500 ppm, aos 90 dias. O peso relativo do fígado foi maior em 1250 e 2500 ppm aos 28 dias e apenas em 2500 ppm aos 90 dias. Aos 28 dias, os níveis de albumina e proteína total foram maiores nos três grupos expostos e os níveis de creatinina e uréia aumentaram apenas no grupo 2500 ppm. A análise histológica revelou que o Diuron, especialmente na maior concentração levou à depleção de polpa branca no baço, associada a redução do número de linfócitos T CD4⁺ e aumento de hematopoiese extramedular, deposição de hemosiderina e hiperplasia eritróide na polpa vermelha. Não foram observadas alterações hematológicas importantes. Com relação à análise fenotípica das subpopulações de linfócitos, observamos uma redução de células CD4⁺. Nas condições do experimento concluímos que o Diuron exerce efeitos tóxicos sistêmicos e órgão-específico nas maiores concentrações.

Palavras-chave: Diuron, Imunotoxicidade, Órgãos linfóides, Linfócitos, Ratos

Abstract

Few information is available regarding immunotoxic potential of Diuron, a phenylurea herbicide widely used in Brazil and around the world on sugar cane, cotton, coffee, pineapple, citros, alfafa and wheat crops. The objective of the present study was to evaluate the toxicity of Diuron in the immune system. General parameters of toxicity were evaluated and biochemistry, hematology, histologic aspects of lymphohematopoietic organs and CD4⁺ CD8⁺ and CD45RA⁺ splenic lymphocytes subpopulations of male Wistar rats. Two experimental protocols were used: I – Acute toxicity (28 days) and II – Sub-Chronic toxicity (90 days) and the animals were treated with 125 ppm, 1250 ppm and 2500 ppm of Diuron by feeding. The experimental groups treated with Diuron at 1250 ppm and 2500 ppm, showed decreased body weight gain after 28 and 90 days of treatment, corresponding with the reduced food intake. The relative weight of the spleen and kidneys were higher at the three concentrations in the end of 28 days, and only at 2500 ppm after 90 days. The relative weight of the liver was higher at 1250 ppm and 2500 ppm to the 28 days, and only at 2500 ppm to the 90 days of treatment. After 28 days, the albumin and total protein serum levels were higher at the three treated groups and the creatine and urea higher only at 2500 ppm of Diuron. The treatment with Diuron at higher doses causes the depletion of the lymphoid white pulp and increases the hemosiderin deposition in the red pulp. We didn't observed significant hematological alterations between the treated and control groups. Regarding fenotypic analysis of splenic lymphocytes, it was observed a decrease in CD4⁺ subpopulations at 1250 ppm and 2500 ppm in the end of 28 days, and only at 2500 ppm after 90 days of treatment compared with the control groups values. Concluding, Diuron had a systemic toxic effect and also on lymphohematopoietic organs.

Key-Word: Diuron, Immunotoxicity, lymphoid organs, lymphocytes, rats

1. Introdução

Historicamente, a maior preocupação com relação aos possíveis efeitos adversos de agentes químicos voltava-se principalmente para o estudo de seu potencial cancerígeno. Contudo, pesquisadores passaram a reconhecer a importância de eventos adversos não-cancerígenos, tais como imunotoxicidade e teratogênese, no perfil tóxico de substâncias as quais a população está exposta em diferentes níveis (Boffetta, 2006).

Várias classes de substâncias podem afetar o sistema imunológico favorecendo o aparecimento de infecções e aumento da incidência de neoplasias, principalmente relacionadas à imunossupressão; ou respostas alérgicas e auto-ímmunes, decorrentes da estimulação da uma resposta imunológica (Inadera, 2006). Esta disfunção imunológica pode ser resultado, da ação direta ou indireta do xenobiótico (incluindo seus metabólitos) sobre o sistema imunológico, da resposta do hospedeiro a uma determinada substância ou a seus subprodutos, ou ainda da alteração antigênica do hospedeiro pelo composto ou seus derivados (Kimber & Dearman, 2002). Dentre as substâncias conhecidamente imunotóxicas estão os compostos bifenis policlorados (PCBs), dioxinas, praguicidas, metais pesados, entre outras (Luster & Rosenthal, 1993; Voccia et al., 1999).

Na literatura há poucas informações a respeito do potencial imunotóxico do Diuron, um praguicida da classe feniluréia amplamente utilizado em culturas agrícolas como cana-de-açúcar, café, citros, soja e alfafa. O Diuron é um herbicida de classificação toxicológica II a IV (altamente a moderadamente tóxico) e ambiental nível II (produto muito perigoso), (Segundo CD do Sistema de Informações Toxicológicas Sobre Agrotóxicos - Agência de Vigilância Sanitária, Brasil). Sua absorção ocorre no trato gastrointestinal e sistema respiratório. Em seres humanos, é metabolizado pelo fígado por hidroxilação e N-dealquilação, sendo excretado pela urina (Hayes, 1982).

Na Literatura os estudos reprodutivos mostram que o Diuron apresenta atividade fetotóxica (Khera., 1979; EPA, 1987; Fernandes, 2007). Quanto ao potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade os dados são controversos. O Diuron apresentou atividade mutagênica em alguns testes (Seiler, 1978; Anon,1987, Agrawal & Mehrotra, 1997,Dupont de Nemours, 1985) e atividade cancerígena principalmente para mama e bexiga de roedores (Iyer, 2002; Nascimento et al, 2004). Quanto ao seu potencial imunotóxico há poucos trabalhos na Literatura. Um estudo *in vitro* utilizando-se células mononucleares de sangue periférico humano de doadores normais mostrou que o

Diuron administrado às culturas nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM, inibiu a produção de IL-5, IFN- γ e TNF- α (Hooghe et al., 2000). Ratas expostas às doses de 250-1000 mg/kg de Diuron na dieta por 14 meses apresentaram aumento do peso do baço, aumento de hemossiderina e formação de aductos de hemoglobina com aminas aromáticas liberadas do herbicida (Wang et al., 1993).

Considerando a escassa Literatura sobre o potencial imunotóxico do Diuron e que vários praguicidas podem afetar o sistema imunológico levando a sua disfunção, no presente trabalho, utilizando modelos de toxicidade aguda e sub-crônica, avaliamos como parâmetros de imunotoxicidade aspectos hematológicos, histologia dos órgãos linfohematopoiéticos e fenotipagem de linfócitos T CD4, T CD8 e B para caracterizar o potencial imunotóxico do herbicida. Para tal estudo foram seguidos critérios estabelecidos pelos “Guidelines” da OECD 407 (1995), para testes agudos - 28 dias e 408 (1998), para testes de exposição sub-crônica - 90 dias e “Guideline” OPPTS 870.7800 Immunotoxicity do EPA, 1998.

2. Material e Métodos

2.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos Wistar machos com cerca de 8 semanas de idade, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Campinas, SP) foram acondicionados em caixas de propileno com maravalha branca de pinho autoclavada e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, sob condições ambientais controladas (temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa $55 \pm 20\%$, ciclo de luz claro/escuro 12/12h e 4 períodos diários de exaustão). Os animais receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (NUVITAL, PR) e água filtrada fornecida *ad libitum* e foram submetidos a um período de aclimatação por 2 semanas antes do início do experimento. O manuseio dos animais foi realizado de acordo com os princípios estabelecidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o protocolo de no. 492 (Anexo 1).

2.2 Preparo da ração

A exposição dos animais ao Diuron foi realizada por via oral, sendo o herbicida adicionado à ração em pó (Nuvilab-CR1), nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm e, posteriormente, após completa homogeneização (misturador Weg - Rio Claro, SP), peletizada (Peletizadora Chavantes, modelo 7,5 c.v - Chavantes, SP) e seca por ventilação. A ração foi armazenada em sacos devidamente identificados e, mantida, durante todo o período experimental, em freezer à temperatura $- 20^\circ\text{C}$, sendo manuseada apenas no momento do fornecimento aos animais.

2.3 Protocolo experimental

O delineamento experimental seguiu os protocolos apresentados na Figura 2. Protocolo de 28 dias (toxicidade aguda): constituído por 4 grupos experimentais, tendo o grupo I (controle) recebido ração basal e os grupos II a IV ração acrescida de Diuron nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, respectivamente. Protocolo de 90 dias (toxicidade sub-crônica): constituído por 7 grupos experimentais, sendo os grupos I a IV

idênticos aos do experimento de 28 dias, mas expostos ao Diuron por 90 dias, o grupo V, com fornecimento de ração basal pareado ao consumo do grupo 2500 ppm (para controlar a variável referente ao consumo reduzido de ração no grupo de maior dose, garantindo a interpretação adequada do possível potencial de imunotoxicidade do herbicida) e os grupos VI e VII (avaliados ao final de 120 dias) que receberam ração basal e Diuron 2500 ppm durante 90 dias, respectivamente, para observação da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento. A evolução de peso corpóreo dos animais e os consumos de ração e de água foram avaliados semanalmente durante todo o período experimental.

2.4. Análise hematológica

As amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca (5-6ml por animal) após anestesia dos animais com pentobarbital sódico a 4 % (30 mg/kg de peso corpóreo), aos 28, 90 e 120 dias do início do experimento (conforme apresentado no item Delineamento experimental). Destas amostras foi realizada a extração do soro para as análises bioquímicas e sangue para confecção de esfregaços sanguíneos corados com Leishman para contagem diferencial de células granulocíticas e mononucleares (100 células/lâmina) em microscopia de luz convencional.

2.5. Dosagens bioquímicas

As amostras de soro foram utilizadas para a determinação dos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato transferase (AST), proteína total, creatinina e uréia com a utilização de kits comerciais e leitura fotométrica, realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

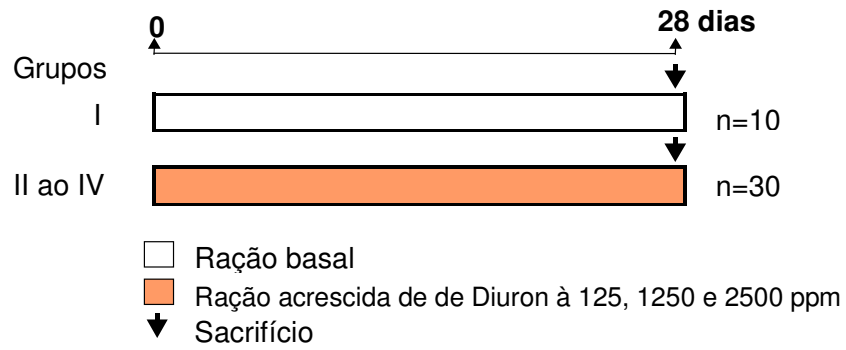
2.6. Coleta de órgãos e processamento de tecidos

Para análise histológica, o fígado, rins, adrenais, baço, timo, linfonodos mesentéricos e o fêmur direito e esquerdo (para análise histológica e citológica da medula óssea, respectivamente) foram retirados e fixados em formalina 10 %

tamponada (tampão fosfato pH = 7,2) por 48 horas. Em seguida, os órgãos foram mantidos em água por 24 horas para se retirar o excesso de formol e, finalmente, conservados em álcool 70% até o momento do processamento histológico e inclusão em parafina. O baço foi dividido em duas porções, uma para histologia e outra para obtenção de células totais utilizadas para análise de subpopulações de células em citômetro de fluxo. O fêmur foi descalcificado em solução citrato de sódio + ácido fórmico durante 10 dias antes do recorte e inclusão em parafina. O processamento histológico seguiu método convencional e os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica.

Cortes histológicos de baço foram corados para hemosiderina de acordo com o método de Perls (Luna, 1968). Os critérios para análise histológica dos órgãos linfohematopoiéticos estão apresentados na Tabela 1, seguindo critérios semi-quantitativos apresentados por Kuper et al. (2000).

✓ **Protocolo 28 dias**



✓ **Protocolo 90 dias**

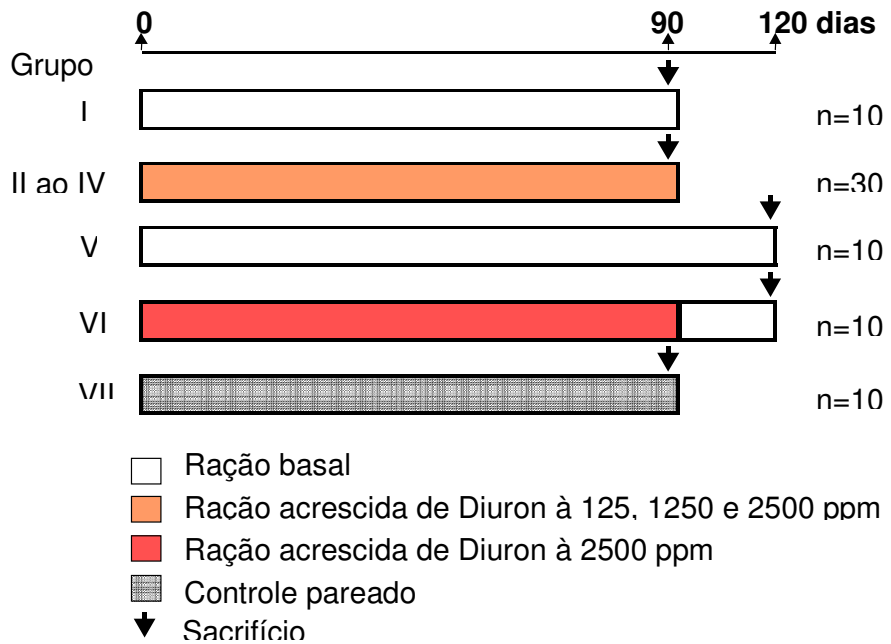


Figura 2 - Protocolo Experimental.

Tabela 1. Critérios para análise histopatológica de órgãos linfohematopoiéticos.

<i>Órgãos</i>	<i>Alterações nos órgãos ^a</i>
Medula óssea	Alterações da celularidade (aumentada ou diminuída, relação mielóide/eritróide) e da maturação das séries mielóide e eritróide
Timo	Relação córtex/medula, alterações da celularidade na córtex e medula, macrófagos em aspecto de céu estrelado
Baço	Alterações da celularidade na polpa branca (PALS ^b , na zona marginal, folículos) e da polpa vermelha, hematopoiese extramedular
Linfonodos mesentéricos	Alterações da celularidade nas áreaa paracortical, cortical e medular, desenvolvimento de centro germinativo, formação de roseta eritrocitária, histiocitose, plasmocitose

^aBaseado em critérios estabelecidos por Kuper et al., 2000 e Spinardi-Barbisan et al., 2004; ^bPALS, sigla do inglês: *bainha linfocítica periarteriolar*.

A análise histológica da medula óssea seguiu critérios semi-quantitativos (“score”) sendo considerado para o grau de maturação das células o valor 0 para ausência de maturação, 1 leve, 2 moderada e 3 intensa. A relação linfóide/eritróide foi considerada diminuída quando se apresentava na relação 2:1 (“score” 1), normal na relação 3:1 e 4:1 (“score” 2) ou aumentada nas relações 5:1 (“score” 3). Os critérios de avaliação seguiram as padronizações utilizadas na rotina de análises do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

2.7. Preparo das células do baço

Um fragmento de cada baço foi utilizado para a obtenção de células, desagregadas mecanicamente sobre peneira de náilon, em placas de petri contendo meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, Brasil). As células totais obtidas foram centrifugadas, resuspendidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Cultilab, Campinas, Brasil) e lavadas duas vezes a 1500 rpm, por 10 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo azul de tripan, considerando-a adequada para valores superiores a 90 %. Alíquotas destas suspensões celulares foram ajustadas em concentrações de 5×10^6 células/ml e criopreservadas em meio RPM-1640 contendo dimetilsulfóxido 10% (DMSO, Carlo Erba Reagents) para análise das subpopulações de linfócitos.

2.8. Marcação das células e análise em citômetro de fluxo

Suspensões celulares do baço obtidas conforme descrito no item anterior foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e, em seguida, transferidas para tubos contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após centrifugação (10 min a 1000 rpm) o pelete celular foi ressuspendido em 3 ml de solução isotônica (Advia70, Bayer), sendo centrifugadas novamente para se evitar interferências da fluorescência natural do meio de cultura durante a análise em citômetro de fluxo. O pelete obtido foi ressuspendido em 1 ml de solução isotônica. A concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/ml e a viabilidade celular avaliada pelo azul de tripan. Alíquotas de 100 μ l das suspensões de linfócitos foram incubadas, com os anticorpos apropriados, por 30 minutos, ao abrigo da luz. As amostras foram marcadas com anticorpos anti-rat CD45RA OX-33 (para linfócitos B) e CD4 OX-38 (para linfócitos T) conjugados com ficoeritrina (PE) e anticorpo anti-rat CD8 OX-8 (para linfócitos T) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Pharmingen, City, State) ou com seus isotipos controles apropriados: mouse IgG1 (FITC), mouse IgG2a (PE).

A análise das células foi avaliada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Beckton Dickinson, USA), sendo 10 mil eventos quantificados. As células do baço foram caracterizadas conforme critérios de granulosidade e tamanho celular (“Foward Scatter” (FC) e “Side Scater” (SSC)), com áreas (“gates”) definidas, a fim de se excluir plaquetas, hemáceas e células mortas. Os dados foram apresentados como porcentagem de células positivas em seus respectivos “gates”.

2.9. Análise estatística

O peso corpóreo e dos órgãos, consumo de água e de ração, os dados bioquímicos e hematológicos foram avaliados pela ANOVA ou Kruskal-Wallis. Para todas as análises foi considerado nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. *Peso corpóreo, consumo de ração e água e peso de órgãos*

Os resultados das análises de peso corpóreo aos 28 e 90 dias de exposição ao Diuron estão apresentados na Tabela 2. A exposição ao Diuron resultou em redução significativa ($p < 0,001$) do ganho de peso corpóreo médio nos grupos 1250 (- 25 a 30 %) e 2500 ppm (- 46,0 %) quando comparado aos valores dos grupos controle e 125 ppm, aos 28 e 90 dias (Tabela 2). Aos 90 dias de exposição ao herbicida, o grupo 2500 ppm apresentou redução significativa ($p < 0,001$) do ganho de peso corpóreo médio em relação aos grupos 1250 ppm e ao grupo controle pareado. Ao final de 90 dias, o grupo controle pareado apresentou redução significativa ($p < 0,001$) do peso corpóreo médio final e do ganho de peso médio quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). O grupo 2500 ppm 30 dias pós-tratamento (90 dias) manteve a redução significativa ($p < 0,02$) do peso corpóreo final médio e do ganho de peso corpóreo médio (Tabela 2) acompanhada da redução significativa ($p = 0,001$) do consumo de ração em relação ao respectivo grupo controle (Tabela 3). Aos 28 e 90 dias de exposição ao herbicida foi observada redução significativa ($p = 0,002$) do consumo de ração, nos grupos 1250 e 2500 ppm quando comparados ao grupo controle (Tabela 3). Na Tabela 3 são mostrados os valores médios de ingestão do Diuron nos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas no consumo de água entre os diferentes grupos experimentais em ambos os estudos (dados não mostrados).

O peso relativo do baço e dos rins foi significativamente ($0,01 < p < 0,001$) maior nas três concentrações de Diuron (125, 1250 e 2500 ppm) aos 28 dias. Aos 90 dias foi observado aumento significativo ($0,01 < p < 0,001$) do baço apenas nos grupos 1250 e 2500 ppm e dos rins no grupo 2500 ppm (Tabela 4). O peso relativo do fígado foi significativamente ($p < 0,001$) maior nos grupos 1250 e 2500 ppm aos 28 dias, e apenas no grupo 2500 ppm aos 90 dias (Tabela 4). Os pesos relativos do timo e das adrenais não foram alterados em decorrência do tratamento agudo ou sub-crônico com diuron. Após trinta dias do término da exposição ao Diuron, os animais expostos à concentração de 2500 ppm apresentaram valores semelhantes de pesos relativos do fígado, rins e baço quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 4).

Tabela 2. Peso corpóreo inicial, final e ganho¹ de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.

Tratamento	n ^o efetivo de animais	Peso Corpóreo (g)			Ganho Relativo ²
		Inicial	Final	Ganho	
28 dias					
Controle	10	236,80 ± 20,32 ^a	358,50 ± 29,94 ^a	121,70 ± 17,38 ^a	---
125 ppm	10	235,90 ± 18,78 ^a	363,80 ± 33,73 ^a	127,90 ± 21,56 ^a	+ 5,1
1250 ppm	10	239,90 ± 19,67 ^a	325,60 ± 32,81 ^b	85,70 ± 18,26 ^b	- 29,6
2500 ppm	10	233,30 ± 18,40 ^a	299,00 ± 27,48 ^b	65,70 ± 20,40 ^b	- 46,0
90 dias					
Controle	10	215,20 ± 21,58 ^a	440,10 ± 36,11 ^a	224,90 ± 39,50 ^a	---
125 ppm	10	219,10 ± 23,98 ^a	469,80 ± 48,20 ^a	250,70 ± 44,16 ^a	+ 11,5
1250 ppm	10	217,40 ± 21,06 ^a	386,60 ± 41,11 ^b	169,20 ± 37,30 ^b	- 24,7
2500 ppm	10	216,90 ± 16,12 ^a	338,30 ± 19,32 ^c	121,40 ± 14,85 ^c	- 46,0
Controle	9	220,60 ± 21,34 ^a	386,22 ± 27,75 ^b	164,22 ± 19,13 ^b	- 27,0
Pareado					
Controle 120 ³	10	210,60 ± 18,77 ^a	461,70 ± 33,08 ^{a*}	251,10 ± 39,27 ^{a*}	---
2500 ppm 120 ⁴	10	216,20 ± 19,97 ^a	422,10 ± 37,24 ^{b*}	205,90 ± 29,35 ^{b*}	-18,0

¹valores expressos em média ± desvio-padrão; ²porcentagem relativa ao grupo controle (Ganho de peso corpóreo do grupo tratado x 100 / ganho de peso corpóreo do grupo controle); ³grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ⁴grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento; letras indicam as diferenças significativas entre os grupos. *diferença significativa quando comparado ao grupo controle 120.

Tabela 3. Consumo médio estimado de ração basal e de Diuron pelos animais controles e tratados com o herbicida por 28 e 90 dias¹.

Tratamento ²	n ^o efetivo de animais	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de Diuron (mg/rato/dia)	Consumo de Diuron (mg/Kg/dia)
28 dias				
Controle	10	25,23 ± 1,24 ^a	-	-
Diuron 125 ppm	10	27,35 ± 1,45 ^a	3,42 ± 0,11	9,4 ± 0,36
Diuron 1250 ppm	10	21,05 ± 1,27 ^b	26,30 ± 2,61	79,58 ± 0,27
Diuron 2500 ppm	10	20,50 ± 3,58 ^b	51,25 ± 2,12	172,38 ± 0,73
90 dias				
Controle	10	26,47 ± 1,38 ^a	-	-
Diuron 125 pm	10	27,05 ± 2,05 ^a	3,38 ± 0,19	7,19 ± 0,92
Diuron 1250 ppm	10	23,69 ± 1,52 ^b	29,61 ± 3,54	76,59 ± 5,67
Diuron 2500 ppm	10	20,88 ± 2,61 ^b	52,2 ± 2,33	154,30 ± 0,20
Controle Pareado	9	22,07 ± 1,55 ^b	-	-
Controle 120 ²	10	26,84 ± 1,48 ^{a*}	-	-
Diuron 2500 ppm 120 ³	10	22,92 ± 3,40 ^{b*}	52,95 ± 1,75	151,50 ± 9,31

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ²grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ³grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento; letras indicam as diferenças significativas entre os grupos. *diferença significativa quando comparado ao grupo controle 120.

Tabela 4. Peso relativo¹ do fígado, rins, adrenais, baço e timo de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.

Tratamento	n ^o efetivo de animais	Fígado	Rins ⁴	Adrenais ⁴	Baço	Timo
28 dias						
Controle	10	3,85 ± 0,35 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	0,008 ± 0,002 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,02 ^a
125 ppm	10	4,22 ± 0,38 ^a	0,33 ± 0,03 ^b	0,009 ± 0,002 ^a	0,44 ± 0,06 ^b	0,17 ± 0,03 ^a
1250 ppm	10	4,66 ± 0,34 ^b	0,35 ± 0,03 ^c	0,009 ± 0,002 ^a	0,51 ± 0,05 ^c	0,15 ± 0,02 ^a
2500 ppm	10	4,53 ± 0,43 ^b	0,34 ± 0,04 ^c	0,009 ± 0,002 ^a	0,75 ± 0,07 ^d	0,15 ± 0,03 ^a
90 dias						
Controle	10	3,30 ± 0,20 ^{a3}	0,30 ± 0,02 ^a	0,006 ± 0,002 ^a	0,31 ± 0,05 ^a	0,11 ± 0,02 ^a
125 ppm	10	3,58 ± 0,18 ^a	0,31 ± 0,03 ^a	0,007 ± 0,002 ^a	0,31 ± 0,06 ^a	0,10 ± 0,02 ^a
1250 ppm	10	3,43 ± 0,57 ^a	0,32 ± 0,02 ^a	0,006 ± 0,002 ^a	0,44 ± 0,08 ^b	0,10 ± 0,02 ^a
2500 ppm	10	3,99 ± 0,21 ^b	0,36 ± 0,02 ^b	0,007 ± 0,002 ^a	0,61 ± 0,06 ^c	0,11 ± 0,02 ^a
Controle	9	2,91 ± 0,39 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	0,005 ± 0,001 ^a	0,35 ± 0,06 ^a	0,09 ± 0,02 ^a
Pareado						
Controle 120 ²	10	3,34 ± 0,46 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	0,005 ± 0,002 ^a	0,34 ± 0,05 ^a	0,10 ± 0,02 ^a
2500 ppm 120 ³	10	3,61 ± 0,40 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	0,005 ± 0,001 ^a	0,39 ± 0,06 ^a	0,10 ± 0,03 ^a

¹peso relativo: calculado a partir do peso absoluto do órgão em relação ao peso do animal x 100, valores expresso em média ± SD; ²grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ³grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento; ⁴valores médios dos rins e das adrenais direita e esquerda; Letras diferentes representam diferença estatística (0,01 < P < 0,001).

3.2. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Não foram observadas alterações significativas dos parâmetros hematológicos avaliados através da porcentagem de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico nos grupos expostos às diferentes

concentrações de Diuron nos delineamentos de exposição aguda (28 dias) e sub-crônica (90 dias) (Tabela 5). No tratamento agudo, foi observado aumento significativo ($0,01 < p < 0,001$) dos níveis de proteína total nos grupos expostos as três diferentes concentrações de Diuron e dos níveis ALT e albumina nos grupos expostos as concentrações de 1250 e 2500 ppm. Os valores de creatinina e uréia, aos 28 dias de exposição foram maiores apenas em 2500 ppm. Animais expostos por 90 dias ao praguicida não revelaram alterações significativas nos níveis séricos dos marcadores pesquisados (Tabela 6).

Tabela 5. Análise quantitativa dos esfregaços sanguíneos de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.¹

Tratamento	n ^o efetivo de animais	Granulócitos (%) ²		Agranulócitos (%)	
		Neutrófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Monócitos
28 dias					
Controle	10	13,10 ± 4,91 ^a	1,00 ± 1,18 ^a	85,50 ± 4,84 ^a	0,50 ± 0,50 ^a
125 ppm	10	10,50 ± 4,94 ^a	1,20 ± 1,08 ^a	86,90 ± 4,74 ^a	0,80 ± 0,87 ^a
1250 ppm	10	7,80 ± 4,45 ^a	1,30 ± 1,10 ^a	89,50 ± 4,67 ^a	0,80 ± 0,98 ^a
2500 ppm	10	9,30 ± 2,76 ^a	1,40 ± 0,66 ^a	87,90 ± 3,11 ^a	1,40 ± 1,20 ^a
90 dias					
Controle	10	12,80 ± 6,53 ^a	1,10 ± 1,10 ^a	84,40 ± 6,42 ^a	1,40 ± 1,51 ^a
125 ppm	10	12,20 ± 3,58 ^a	1,00 ± 1,05 ^a	85,60 ± 4,38 ^a	1,20 ± 1,23 ^a
1250 ppm	10	11,40 ± 4,17 ^a	0,60 ± 0,70 ^a	86,00 ± 4,99 ^a	2,00 ± 1,70 ^a
2500 ppm	10	12,00 ± 4,57 ^a	0,90 ± 0,99 ^a	86,30 ± 4,79 ^a	0,80 ± 1,03 ^a
Controle pareado	9	13,00 ± 4,14 ^a	0,90 ± 0,99 ^a	85,30 ± 3,86 ^a	0,80 ± 0,63 ^a
Controle 120 ³	10	13,00 ± 4,47 ^a	0,60 ± 0,70 ^a	85,80 ± 4,54 ^a	0,60 ± 0,70 ^a
2500 ppm 120 ⁴	10	13,22 ± 3,07 ^a	0,78 ± 0,83 ^a	85,00 ± 4,18 ^a	1,00 ± 1,12 ^a

¹ valores expressos em média ± SD; ² não foram incluídas as contagens de basófilos (frequência baixa); ³ grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ⁴ grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento. Valores normais de referência: Hemopoietic System – Jones, 1990

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos¹ de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.

Tratamento	nº efetivo de animais	ALT	AST	Albumina	Proteína Total	Creatinina	Uréia
28 dias							
Controle	10	38,70 ± 2,45 ^a	98,67 ± 16,86 ^a	2,75 ± 0,21 ^a	5,50 ± 0,38 ^a	0,39 ± 0,03 ^a	51,79 ± 3,45 ^a
125 ppm	10	40,22 ± 2,99 ^a	97,44 ± 19,67 ^a	3,08 ± 0,23 ^{a,b}	5,95 ± 0,40 ^b	0,38 ± 0,06 ^{a,b}	55,17 ± 4,92 ^a
1250 ppm	10	44,50 ± 4,72 ^b	92,29 ± 24,78 ^a	3,16 ± 0,09 ^{b,c}	5,94 ± 0,16 ^b	0,44 ± 0,05 ^{a,b}	53,91 ± 4,17 ^a
2500 ppm	10	43,10 ± 4,68 ^b	93,00 ± 16,98 ^a	3,32 ± 0,15 ^c	6,03 ± 0,28 ^b	0,46 ± 0,07 ^b	55,19 ± 4,83 ^b
90 dias							
Controle	10	55,30 ± 5,72 ^a	133,50 ± 38,49 ^a	2,87 ± 0,13 ^a	5,82 ± 0,13 ^a	0,49 ± 0,06 ^a	59,02 ± 6,15 ^a
125 ppm	10	57,00 ± 8,08 ^a	165,50 ± 58,16 ^a	3,09 ± 0,15 ^a	5,98 ± 0,16 ^a	0,59 ± 0,11 ^a	58,13 ± 10,11 ^a
1250 ppm	10	52,50 ± 7,00 ^a	138,10 ± 56,48 ^a	2,80 ± 0,18 ^a	5,39 ± 0,23 ^a	0,58 ± 0,08 ^a	48,22 ± 10,02 ^a
2500 ppm	10	50,76 ± 7,82 ^a	129,70 ± 22,72 ^a	2,86 ± 0,19 ^a	5,54 ± 0,29 ^a	0,51 ± 0,07 ^a	49,96 ± 5,97 ^a
Controle pareado	9	54,78 ± 10,40 ^a	143,50 ± 58,51 ^a	2,78 ± 0,25 ^a	5,44 ± 0,34 ^a	0,50 ± 0,12 ^a	47,37 ± 6,69 ^a
Controle 120 ²	10	57,44 ± 10,93 ^a	137,80 ± 45,86 ^a	2,77 ± 0,23 ^a	5,68 ± 0,37 ^a	0,52 ± 0,06 ^a	52,98 ± 3,96 ^a
2500 ppm 120 ³	10	61,00 ± 7,38 ^a	138,38 ± 37,09 ^a	2,78 ± 0,17 ^a	5,62 ± 0,48 ^a	0,51 ± 0,09 ^a	53,06 ± 3,89 ^a

¹Valores apresentados na forma de média ± SD; ²grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ³grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento; ³ Letras diferentes representam diferença estatística (0,01 < P < 0,001).

3.3. Análise histológica

Alterações histológicas relevantes foram observadas no baço dos animais expostos ao Diuron (Tabela 7). Os baços dos grupos tratados apresentaram esplenomegalia e as supensões celulares obtidas pigmentação alterada, pela maior concentração de hemossiderina (Figura 3). As alterações foram mais expressivas nos animais tratados com a concentração de 2500 ppm de Diuron, tanto aos 28 como aos 90

dias. Na polpa branca foi observada redução do número de compartimentos, bem como de sua celularidade (principalmente na bainha linfocítica periarteriolar) (). Na polpa vermelha foi observado hiperplasia eritróide, aumento de hematopoiese extramedular e deposição de hemosiderina. Tais alterações se mantiveram 30 dias após o término da exposição dos animais ao Diuron (animais sacrificados ao final de 120 dias). A análise semi-quantitativa da deposição de hemosiderina (coloração de Perls) no baço dos animais expostos mostrou aumento dose-dependente (Figura 2). Não foram encontradas alterações histológicas relevantes nos rins, adrenais, timo, medula óssea e linfonodos mesentéricos. No fígado, principalmente nas concentrações de 1250 e 2500 ppm, 30 a 50 % e 60 a 70 % dos animais desenvolveram hipertrofia centrolobular discreta, aos 28 e 90 dias, respectivamente. Na histologia da medula óssea, a celularidade global, compartimentalização e proporção de tecido adiposo nos diferentes grupos expostos ao Diuron não revelaram diferenças significativas. As variações entre os grupos mantiveram-se dentro da normalidade observada em medulas ósseas saudáveis. A análise das populações eritróide e mielóide demonstrou retardo de maturação leve nos grupos expostos a 1250 ppm e 2500 ppm, para série vermelha, e 2500ppm para série branca, aos 28 dias. Aos 90 dias, foi observado retardo de maturação leve nos grupos expostos a 125 ppm, 1250 ppm e 2500 ppm, para série vermelha, e apenas no grupo 2500 ppm para linhagem mielóide. A relação mielóide:eritróide, aos 28 dias, apresentou-se reduzida no grupo exposto a 2500 ppm e, aos 90 dias, no grupo exposto a 2500 ppm (Tabela 8). O retardo de maturação da linhagem mielóide e a relação mielóide:eritróide reduzida foi mantida 30 dias pós-tratamento (grupo 2500 ppm 120 dias). Não foram encontradas alterações histológicas relevantes nos rins, adrenais, timo e linfonodos mesentéricos.

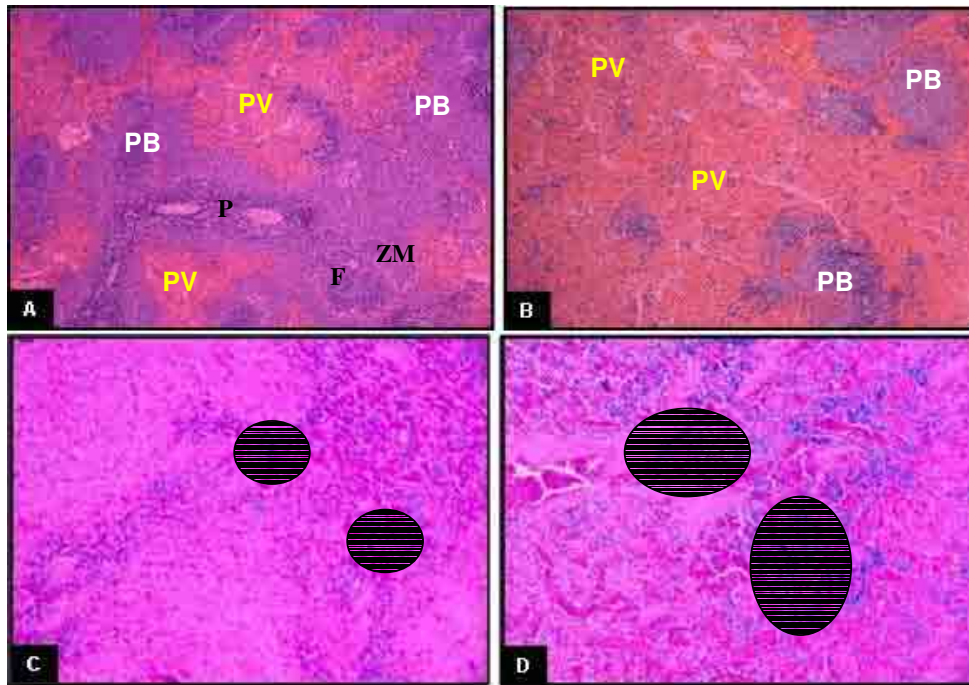


Figura 2. Cortes histológicas de baço corados por H&E (A e B – 10x) ou pelo Método de Perls (C e D – 20x). (A) e (C): baço de animal do grupo controle, (B) e (D): baço de animal do grupo de 2500 ppm. (A) e (B): PB - Polpa Branca, PV - Polpa Vermelha. ZM - Zona Marginal. P - PALS. F - Folículo

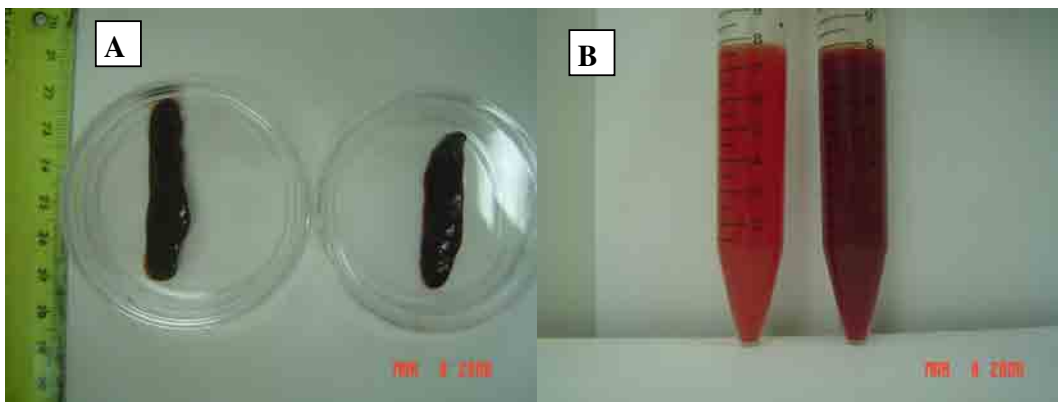


Figura 3. A: Baço de animal tratado com 2500 ppm de Diuron e controle, evidenciando esplenomegalia nas maiores concentrações. B: Aumento de pigmentação observado a partir de suspensões celulares obtidas de animais do grupo controle e tratado com 2500 ppm de Diuron.

Tabela 7. Alterações histológicas no baço de ratos Wistar machos expostos ao Diuron por 28 e 90 dias.

Grupos	no. efetivo de animais	Baço			
		Diminuição da celularidade da PALS ¹	Diminuição da celularidade da ZM ²	Aumento da celularidade da PV ³	Hematopoiese extramedular aumentada
28 dias					
Controle	10	0	0	0	0
125 ppm	9	0	0	2 (22 %)	1 (11 %)
1250 ppm	10	5 (50 %)	1 (10 %)	9 (90 %)	8 (80 %)
2500 ppm	9	9 (100 %)	6 (67 %)	9 (100 %)	9 (100 %)
90 dias					
Controle	9	0	0	0	0
125 ppm	8	0	0	0	4 (50 %)
1250 ppm	9	0	0	0	4 (44 %)
2500 ppm	8	5 (62 %)	0	1 (12 %)	7 (87 %)
Controle Pareado ⁴	8	0	0	0	2 (25 %)
Controle 120 ⁵	8	0	0	0	0
2500 ppm 120	8	8 (100 %)	2 (25 %)	0	8 (100 %)

¹PALS, sigla do inglês: bainha linfocítica periarteriolar; ²Zona marginal; ³Polpa vermelha; ⁴fornecimento de ração basal pareado ao consumo do grupo 2500 ppm (para controlar a variável referente ao consumo reduzido de ração no grupo de maior dose); ⁵grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado 30 dias pós-tratamento para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos.

Tabela 8. Histologia de medula óssea de animais controles e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.

Tratamento	nº efetivo de animais	Alterações histológicas			Relação L/E	Celularidade
		Retardo de Maturação				
		Vermelha	Branca			
28 dias						
Controle	10	-	-	2	80%	
Diuron 125 ppm	10	-	-	2	84%	
Diuron 1250 ppm	10	+	-	2	88%	
Diuron 2500 ppm	10	+	+	1	90%	
90 dias						
Controle	10	-	-	3	76%	
Diuron 125 ppm	10	+	-	3	78%	
Diuron 1250 ppm	10	+	-	2	86%	
Diuron 2500 ppm	10	+	+	1	82%	
Controle pareado	9	-	-	3	74%	
Controle 120 dias	10	-	-	3	70%	
Diuron 2500 ppm 120 dias	10	+	+	1	78%	

²grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ³grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento; **Retardo maturativo**: Score – Normal (-), Retardo leve (+), Retardo moderado (++). **Relação L/E** reduzida (Score 1), normal (Scores 2 e 3) e aumentada (Score 4). **Celularidade global**: avaliação da celularidade e compartimentos da medula óssea.

3.4. Fenotipagem de células do baço

Os resultados da fenotipagem de células do baço de ratos expostos ao Diuron estão apresentados na Tabela 9. O principal efeito decorrente da exposição ao Diuron ocorreu na população de linfócitos T CD4⁺, onde uma diminuição significativa ($p < 0,03$) foi observada no grupo exposto a 2500 ppm, tanto aos 28 como aos 90 dias. Não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de células T CD8⁺ e de linfócitos B nos diferentes grupos tanto aos 28 como aos 90 dias de exposição ao Diuron.

Tabela 9. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B CD45RA⁺ no baço de animais controles¹ e tratados com Diuron por 28 e 90 dias.

Tratamento	n ^o efetivo de animais	Linfócitos		
		CD4	CD8	CD45RA
28 dias				
Controle	10	18,50 ± 4,84 ^a	11,53 ± 3,04 ^a	18,40 ± 10,03 ^a
125 ppm	10	13,30 ± 4,74 ^b	15,34 ± 9,97 ^a	21,02 ± 12,43 ^a
1250 ppm	10	15,97 ± 6,11 ^{ab}	13,82 ± 4,97 ^a	27,33 ± 12,22 ^a
2500 ppm	10	13,28 ± 6,17 ^b	10,18 ± 4,96 ^a	20,38 ± 14,33 ^a
90 dias				
Controle	10	19,34 ± 8,84 ^a	12,29 ± 5,76 ^a	21,12 ± 5,91 ^a
125 ppm	10	18,28 ± 8,44 ^a	11,00 ± 4,84 ^a	21,66 ± 10,44 ^a
1250 ppm	10	15,06 ± 6,26 ^a	12,47 ± 5,84 ^a	23,30 ± 14,86 ^a
2500 ppm	10	11,27 ± 4,88 ^b	9,86 ± 4,98 ^a	23,85 ± 13,95 ^a
Controle Pareado	9	20,02 ± 7,58 ^a	16,71 ± 6,89 ^a	21,60 ± 10,15 ^a
Controle 120 ²	10	16,17 ± 5,91 ^a	11,27 ± 3,07 ^a	21,49 ± 10,00 ^a
2500 ppm 120 ³	10	15,77 ± 5,58 ^a	11,69 ± 3,85 ^a	28,35 ± 14,57 ^a

Valores expressos em porcentagem de linfócitos CD4, CD8 e CD45RA ± SD. ¹ grupo controle que recebeu ração basal durante 28 e 90 dias ² grupo satélite que recebeu ração basal por 120 dias; ³ grupo satélite tratado por 90 dias com Diuron e avaliado em 120 dias para análise da reversibilidade, persistência ou ocorrência tardia de efeitos tóxicos 30 dias pós-tratamento

4. Discussão

A análise do potencial imunotóxico deve ser estruturada em modelos de toxicidade aguda, sub-crônica ou crônica seguindo os procedimentos usados pelas agências de regulamentação de substâncias (De Jong & Van Loveren, 2007). O potencial imunotóxico pode ser obtido a partir de teste hematológico padrão, e pela avaliação estrutural e funcional de órgãos e tecidos linfohematopoiéticos tais como baço, timo, medula óssea, linfonodos e tecidos linfóides associados à mucosa (Haley et al., 2005). A análise histopatológica destes órgãos é um requerimento necessário nos “guidelines” para testes sub-crônicos no mundo (OECD, 1998).

O intrincado balanço característico do sistema imunológico, o torna susceptível a ação de substâncias incluindo praguicidas, que podem causar alterações estruturais e funcionais para o sistema (Voccia et al., 1999). Embora, vários praguicidas sejam conhecidos por exercer atividade imunossupressora, poucos estudos avaliam o potencial imunotóxico do Diuron, um herbicida amplamente utilizado em culturas agrícolas no Brasil e no mundo.

Neste contexto, no presente estudo, avaliamos a histopatologia de órgãos linfohematopoiéticos e a fenotipagem de linfócitos para caracterizar o potencial imunotóxico do Diuron em modelo experimental de toxicidade aguda e sub-crônica.

Os resultados mostram que o Diuron, após exposição aguda ou sub-crônica, exerce efeito deletério dose-dependente, principalmente sobre o baço, causando aumento do seu peso, redução dos compartimentos de polpa branca e de sua celularidade, aumento na celularidade da polpa vermelha, aumento da hematopoiese extramedular e da deposição de hemosiderina, em ratos Wistar machos. Resultados semelhantes aos nossos foram relatados em estudos seguindo a exposição a praguicidas como 2,4-diclorofenoxiacético e clorprofam (Kaioumova et al., 2001; Fujitani et al., 2001). A exposição aguda e sub-crônica ao Diuron também resultou em redução significativa do ganho de peso corpóreo médio nas maiores concentrações, e, aumento do peso relativo do fígado e hipertrofia centrolobular hepática, na maior concentração.

A redução do peso corpóreo pode estar diretamente relacionada às reduções do consumo de ração, conforme observado em nosso estudo nos grupos expostos às concentrações de 1250 e 2500 ppm. No entanto, no estudo sub-crônico, o

monitoramento da ingestão da ração basal equiparada ao consumo do grupo exposto a 2500 ppm de Diuron, mostra que nesta concentração, embora ambos os grupos (2500 ppm e ração basal pareada) tenham consumido a mesma quantidade de ração, o ganho de peso corpóreo foi menor nos animais tratados com 2500 ppm. Estes resultados demonstram, portanto, que o Diuron exerce efeito sistêmico deletério dose-resposta, com maior efeito adverso na concentração de 2500 ppm. É importante destacar que esta alteração foi mantida 30 dias pós-tratamento, quando observamos que o grupo 2500 ppm comparado ao seu respectivo controle manteve a redução do peso corpóreo, acompanhada pela redução significativa do consumo de ração.

No presente estudo, baseando-se no consumo médio de ração, as doses médias de ingestão de diuron foram cerca de 0,24%, 2,29%, 4,80% da DL_{50} para as concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, respectivamente (média dos estudos de 28 e 90 dias). Estes resultados mostram que os níveis de exposição ao Diuron ficaram bem abaixo da dose letal a 50% (DL_{50}) oral estabelecida como sendo cerca de 3400 mg/kg (dose aguda, 14 dias) em ratos Wistar machos (Hodge et al., 1967). Embora os níveis de exposição ao Diuron tenham sido bem baixos, os grupos expostos as maiores concentrações (1250 e 2500 ppm) apresentaram redução do ganho de peso corpóreo acompanhada de redução do consumo de ração e esplenomegalia. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que apresentam tais alterações, associadas à diminuição dos valores de hematócrito e contagem de eritrócitos, em ratos expostos a altas concentrações de Diuron na ração (igual ou superior a 2500 ppm) (Hodge et al., 1967; Wang et al., 1993). Se tomarmos como referência a dose máxima tolerada (DMT), utilizada em estudos sub-crônicos de 90 dias, calculada a partir da dose na qual ocorre diminuição de ganho de peso corpóreo em torno de 10% (Reno, 1997), a diminuição de ganho de peso corpóreo nos grupos expostos as maiores concentrações de Diuron foi acima de 27% para 1250 ppm e acima de 46% para 2500 ppm. Além disso, vale ressaltar que 30 dias pós-tratamento, o peso corpóreo se manteve abaixo do grupo controle, mas, em especial, o peso relativo do baço, retornou a valores semelhantes aos de seu respectivo grupo controle.

Embora o peso relativo do baço tenha se restabelecido pós-tratamento, as alterações histológicas ainda foram observadas 30 dias após o término da exposição ao Diuron. Estes achados mostram que as alterações ocorridas não foram restauradas por completo neste período. Dados da Literatura mostram que a reversão das lesões em órgãos linfóides após o término da exposição a compostos como glicocorticóides e

organotinas pode ser possível, sendo que a regeneração tecidual poderia ocorrer dentro de um período relativamente curto de 3 a 4 semanas (Schuurman and Kuper, 1995).

Em nosso estudo, os parâmetros hematológicos não mostraram alterações significativas após a exposição ao Diuron, tanto aguda como sub-crônica. Os valores observados estão de acordo com os padrões de normalidade para ratos machos conforme apresentado por Jones(1990). Por outro lado, foi observado aumento do número de eritrócitos (hiperplasia eritróide) na medula óssea e aumento dose-dependente no baço, principalmente no grupo exposto a maior concentração de Diuron. Associado a estes achados foi observado aumento dose-dependente do peso relativo do baço, deposição de hemosiderina e hematopoiese extramedular caracterizada pelo aumento de agregados eritropoiéticos difusos na polpa vermelha do baço. No rato, o baço funciona como um órgão hematopoiético adicional durante períodos de estresse o que pode levar ao aumento da hematopoiese extramedular, caracterizada pela presença no baço de células normalmente encontradas na medula óssea (Lomax et al., 1990). Além disso, a prevalência desses precursores eritróides no baço pode ocorrer secundariamente a um processo hemorrágico ou destruição de hemáceas (anemia hemolítica ou auto-imune). Da mesma forma, a deposição aumentada de hemosiderina no baço pode ser uma consequência da fagocitose de eritrócitos que foram danificados, provavelmente, pela exposição ao Diuron, sugerindo que este herbicida apresente atividade hemolítica. A anemia hemolítica e metahemoglobinemia podem ocorrer em decorrência de efeitos tóxicos ocasionados pela exposição a diversas substâncias, entre elas, as drogas arilaminas (Wang et al., 1993). A formação de metahemoglobina é o efeito tóxico dominante observado em animais de laboratório e seres humanos expostos a compostos amino e nitro aromáticos (Wang et al., 1993). Os herbicidas feniluréia, como o Diuron, são derivados da arilamina. Por exemplo, a formação de metahemoglobina é mostrada em animais de laboratório expostos à classe dos herbicidas feniluréia em decorrência das aminas hidrolisadas destes compostos (McMillan et al., 1990). Portanto, parâmetros mais apurados, como dosagem de metahemoglobina e contagem de células vermelhas no sangue devem ser realizados para afirmar a possível relação entre a exposição ao Diuron e a anemia hemolítica.

O baço é considerado um importante órgão-alvo para avaliação de imunotoxicidade em decorrência de suas funções. Por se tratar de um órgão linfóide secundário, que contém cerca de um quarto dos linfócitos do organismo e iniciar a resposta imunológica aos antígenos, o baço é considerado um bom indicador de resposta

do hospedeiro frente à agressão por substâncias. A polpa branca é subdividida em PALS, folículos e zona marginal e é composta por linfócitos, macrófagos, células dendríticas, plasmócitos, arteríolas e capilares. Em especial, na PALS, composta predominantemente por pequenos linfócitos é que se concentram as células T CD4⁺. Em nosso estudo foi observada redução do número de linfócitos T CD4⁺ no baço dos animais expostos às diferentes concentrações de Diuron. Estes resultados se relacionam com a redução do número de compartimentos de polpa branca, bem como de sua celularidade (principalmente na PALS) observada na análise histológica tanto no estudo agudo como sub-crônico. Estas alterações foram mais expressivas na maior concentração (2500 ppm). As lesões degenerativas não-proliferativas espontâneas como a redução da polpa branca, polpa vermelha ou de ambas, é mais comum em ratos ou camundongos velhos (Suttie, 2006). Entretanto, tais alterações podem ocorrer como efeito direto relacionado ao tratamento ou efeito secundário ao reduzido ganho de peso corpóreo ou perda de peso (Suttie, 2006).

As alterações histológicas não foram restritas aos órgãos linfóides. Elas foram também observadas no fígado dos animais expostos ao Diuron, principalmente nas maiores concentrações (1250 e 2500 ppm). O fígado é o principal órgão-alvo de toxicidade química. Isto ocorre devido ao fato de muitas substâncias serem metabolizadas no fígado antes de serem eliminadas do organismo, freqüentemente através da bile. As células centrolobulares são geralmente as mais susceptíveis a toxicidade pelo fato de apresentarem maior quantidade de enzimas de Fase I e menor quantidade das enzimas de Fase II quando comparadas às células periportais (Jacobson, 2001) Alterações morfológicas prévias podem ser identificadas através de resultados da química clínica. Normalmente a injúria hepatocelular é associada com aumento nos níveis das enzimas ALT, AST e sorbitol desidrogenase (SDH) (Jacobson, 2001). Em estudos agudos, sub- crônicos ou crônicos de toxicidade oral do diuron em ratos, as alterações hepáticas descritas foram restritas apenas ao aumento de pigmentação em células de Kupffer, necrose e esteatose hepatocítica (Hodge et al., 1967; Boyd & Krupa, 1970; Agrawal & Kumar, 1999). Em nosso estudo, a exposição aguda e sub-crônica ao diuron induziu hipertrofia centrolobular hepática principalmente nas concentrações de 1250 e 2500 ppm associado ao aumento do peso relativo do fígado. Resultados similares foram relatados em estudos anteriores (Grassi et al., 2006, Fernandes et al., 2006). Estes achados estão relacionados à característica do Diuron de apresentar atividade indutora de enzimas do sistema P450 hepático (Schoket et al.,

1987; Schoket e Vincze, 1985,1990). Vários estudos mostraram que este herbicida induz aumento no conteúdo do citocromo P450 e da NADPH-citocromo redutase e a atividade das enzimas benzo(a)pireno monooxigenase, 7-etoxicoumarina O-deetilase, aminopirina N-demetilase, epóxido hidrolase, UDP-glicoroniltransferase e glutatona S-transferase (Schoket et al., 1987; Schoket e Vincze, 1985,1990).

Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que a exposição de ratos Wistar machos ao Diuron exerce efeito tóxico sistêmico dose-resposta e órgão específico, atuando preferencialmente no baço. Além disso, é possível que exerça atividade hemolítica, conforme demonstrado pelo aumento de hemosiderina, hematopoiese extramedular e a presença de hiperplasia eritródica, na polpa vermelha. Tais alterações não foram reversíveis no período de recuperação avaliado, sugerindo a significância das lesões observadas no baço frente a exposição ao Diuron. Para determinar o quanto as alterações estruturais observadas interferem sobre o desempenho do sistema imunológico parâmetros funcionais devem ser avaliados.

Referências

1. Agrawal RC, Mehrotra NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Indian J. Exp. Biol.* 1997; 35:1256
2. Anon D. *Proper. Ind. Mater. Report.* 1987; 7 : 49.
3. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology. 1985 (DPR # 106-035).
4. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res.* 2006;608(2):157-62
5. Boyd EM, Krupta V. Protein deficiency diet and Diuron toxicity. *J Agric Food Chem.* 1970; 18:1104-1107.
6. De Jong WH, Van Loveren H. Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. *Methods.* 2007;41(1):3-8.
7. Dupont de Nemours & CO. Mutagenicity studies with Diuron. Salmonella test, No. HLR 471-84 (7185); CHO/HGPRT forward gene mutation assay, H.R. No. 282-85 (06/28/85); unscheduled DNA synthesis test in primary rat hepatocytes
8. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Health effects test guidelines: OPPTS 870.7800 Immunotoxicity. 1996.
9. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Increased incidence of malignant and combined malignant and benign tumors in male and female rats and increased incidence of malignant tumors in female mice. 1987
10. Fernandes GS, et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol.* 2007;23(1):106-12.

11. Fujitani T, Tada Y, Noguchi AT, Yoneyama M. Effects of chlorpropham (CIPC) on the hemopoietic system of rats. *Food Chem Toxicol.* 2001;39(3):253-9.
12. Grassi, T. Avaliação da carcinogenicidade do pesticide Diuron em modelo de carcinogênese de média duração para o fígado de ratos Wistar machos. Tese de Mestrado. 2006
13. Haley P. STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol.* 2005;33(3):404-7
14. Hayes WJ Jr. Pesticides studied in man. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1982; p. 672.
15. Hodge HC, Downs WL, Panner B, Smith D, Maynard E, Clayton J Jr, Rhodes R. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 1967; 5: 513.
16. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe EL Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences.* 2000; 66:2519-2525.
17. Inadera H. The immune system as a target for environmental chemicals: Xenoestrogens and other compounds. *Toxicol Lett.* 2006 14;164(3):191-206
18. Jones TC, Ward JM, Mohr U, Hunt RD. Hemopoietic System. Springer-Verlag. In Lomax L, Keyes DG, Kociba RJ. Extramedullary Hemopoiesis, Spleen, Rat.
19. Kaioumova D, Kaioumov F, Opelz G, Susal C. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere.* 2001;43(4-7):801-5.
20. Khera .S, Whalen C, Trivett G, Ongers G. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1979; 22: 522.

21. Kimber I, Dearman RJ. Immune response: adverse versus non-adverse effects. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30:54-58
22. Luster MI, Rosenthal GJ. Chemical agents and the immune response. *Environ Health Perspect.* 1993;100:219-26
23. McMillan DC, McRae TA, Hinson JA. Propanil-induced methemoglobinemia and hemoglobin binding in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990 ;105(3):503-7.
24. Organization for Economic Cooperation AND Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, 1995.
25. Organization for Economic Cooperation AND Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 408: Subchronic Oral Toxicity-Rodent: 90-day Study, 1998.
26. Schoket B, Vincze I. Dose-related induction of rat hepatic drug-metabolizing enzymes by diuron and chlorotoluron, two substituted phenylurea herbicides. *Toxicol Lett.* 1990;50(1):1-7
27. Schoket B, Vincze I. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1985;56(4):283-8
29. Schuurman HJ, Kuper CF. Pathology of the thymus: changes induced by xenobiotics and gene targeting. *APMIS.* 1995;103(7-8):481-500
30. Seiler J.P. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat. Res.* 1978; 58: 353.
31. Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):466-503
32. Voccia I, Blakley B, Brousseau P, Fournier M. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicol Ind Health.* 1999;15(1-2):119-32

33. Wang SW, Chu C.Y, Wang C.J. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 1993; 31:285-295.

34. Wang SW, Chu C.Y, Wang C.J. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 1993; 31:285-295

Artigo
Capítulo III

Efeitos do herbicida Diuron sobre macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos

Alexandre Domingues¹, Priscila Raquel Martins¹, João Lauro Viana de Camargo¹, Luís Fernando Barbisan², Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan^{1*}

¹Departamento de Patologia, TOXICAM, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

Auxílio Financeiro

A realização deste estudo foi possível pelo Auxílio Financeiro da CAPES (Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) e pela Bolsa de Estudo FAPESP do Mestrando Alexandre Domingues (Proc: 05/01223-7).

¹Autor correspondente

Departamento de Patologia, TOXICAM, Faculdade de Medicina

UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

Fone: 55-0-XX-14-3811-6238 / Fax: 55-0-XX-14-3815-2348

e-mail: anabarbi@fmb.unesp.br

Resumo

Os efeitos do Diuron, um herbicida derivado da uréia, foram avaliados sobre macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos após exposição *in vivo*. Para tal, os animais, previamente estimulados ou não com BCG, foram expostos às concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm de Diuron incorporado à ração por 14 dias consecutivos. Foram avaliados parâmetros como atividade fagocítica, produção de óxido nítrico (NO) e água oxigenada (H₂O₂). A exposição ao Diuron resultou em diminuição significativa do espraçamento de macrófagos de animais estimulados ou não com BCG e expostos as três concentrações de Diuron. Foi observada redução significativa do peso corpóreo dos animais expostos às concentrações de 1250 e 2500 ppm de Diuron. O Diuron não exerceu efeito sobre a fagocitose e liberação de NO e H₂O₂. Os resultados permitem concluir que o Diuron não afeta a atividade de macrófagos. Outros parâmetros devem ser avaliados para determinar seu potencial imunotóxico.

Palavras-chave: Diuron, Imunotoxicidade, Macrófagos, Rato

Abstract

The effects of Diuron, a phenylurea herbicide, were evaluated, on peritoneal macrophages of male Wistar rats, after *in vivo* treatment. The animals, stimulated or not by Onco-BCG, were treated with Diuron at concentrations of 125 ppm, 1250 ppm and 2500 ppm, by feeding, for 14 days. It were evaluated NO and H₂O₂ production, spreading and phagocytosis, Animals treated with Diuron, stimulated or not by Onco-BCG, exhibited reduction of macrophage spreading. Body weight reduction was also observed in the animals treated with 1250 ppm and 2500 ppm of Diuron for 14 days. Diuron did not affected the phagocytosis and NO e H₂O₂ production. It was conclude that Diuron did not affect the macrophages activity. Other parameters should be evaluated to elucidate the immunotoxic potential of this herbicide,

Key-Words: Diuron, Immunotoxicity, Macrophages, Rats

I. Introdução

Diversas substâncias químicas utilizadas na agricultura são reconhecidas como agentes tóxicos, teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (Feber & Cabral, 1991; IARC, 1991). Dentre estas substâncias, alguns praguicidas têm mostrado efeitos imunotóxicos, no entanto, para o Diuron, pouca informação é relatada a respeito de seus efeitos sobre o sistema imunológico. Historicamente, a maior preocupação com relação aos possíveis efeitos adversos de agentes químicos voltava-se principalmente para o estudo de seu potencial cancerígeno. Contudo, pesquisadores passaram a reconhecer a importância de eventos adversos não-carcinogênicos, tais como imunotoxicidade e teratogênese, no perfil tóxico de substâncias as quais a população está exposta em diferentes níveis (Dean, 1989).

O Diuron é um herbicida derivado da uréia cuja aplicação se dá principalmente nas lavouras de café, cana-de-açúcar, algodão, abacaxi, citros, alfafa e trigo, sendo prontamente absorvido pelas raízes e folhas das plantas daninhas, mostrando ação de contato e residual. Este herbicida na forma pura apresenta coloração cristalina, é um composto não-iônico com moderada solubilidade em água (42 mg/L a 20°C). Sua hidrólise é desprezível em pH neutro, mas aumenta em algumas condições em que o pH se torna fortemente ácido ou alcalino. Devido a sua alta persistência, que pode variar de um mês a um ano, o Diuron pode ser uma potencial fonte de contaminação para o solo, sedimentos e água, (Giacomazzi & Cochet, 2004).

A absorção do Diuron se dá no trato gastrointestinal e no sistema respiratório. No homem é metabolizado no fígado por hidroxilação e N-dealquilação, sendo em seguida excretado pela urina (Hayes, 1982). Em ratos e cães foi observada excreção também pelas fezes. O Diuron pertence à classe dos indutores enzimáticos do sistema de oxidases mistas (enzimas do citocromo P450), aumentando o conteúdo enzimático do sistema em aproximadamente 50%, quando comparado à praguicidas similares (Schoket & Vincze, 1985).

Na Literatura os estudos reprodutivos mostram que o Diuron apresenta atividade fetotóxica (Khera et al., 1979; EPA, 1987.). Quanto ao potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade os dados são controversos. O Diuron apresentou atividade mutagênica em alguns testes (Seiler, 1978; Anon, 1987, Agrawal & Mehrotra, 1997) e atividade

cancerígena principalmente para mama e bexiga de roedores (Iyer, 2002, Nascimento et al., 2006). Considerando a complexidade do sistema imunológico, os macrófagos ativados representam um componente chave da resposta imunológica celular. O processo de ativação dos macrófagos envolve diversas alterações morfológicas, funcionais e metabólicas. Tais células, quando ativadas, tornam-se fagocíticas e aptas a secretar diversas substâncias biologicamente ativas, além de participar nas etapas de processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos. Na Literatura, há poucos estudos mostrando o papel do Diuron sobre componentes do sistema imunológico, especialmente para os macrófagos. Um estudo *in vitro* utilizando-se células mononucleares de sangue periférico humano de doadores sadios mostrou que o Diuron, administrado às culturas nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 μM , inibiu a produção de IL-5, IFN- γ e TNF- α (Hooghe et al., 2000). Ratas expostas ao Diuron em doses de 250, 500 e 1000 mg/kg na ração por 14 meses apresentaram aumento do peso do baço, aumento da deposição de hemossiderina e formação de aductos entre hemoglobina e as aminas aromáticas liberadas metabolicamente do herbicida (Wang et al., 1993). Em estudo recente realizado por nosso grupo foi observado que o Diuron, administrado na dieta na concentração de 2500 ppm, levou ao aumento da deposição de hemossiderina e diminuição do tamanho e da celularidade da polpa branca no baço, além do retardo no processo de maturação da linhagem mielóide observada na medula óssea de ratos Wistar machos em modelo de hepatocarcinogênese química (Grassi et al., 2006).

Considerando a escassa Literatura sobre os possíveis efeitos imunotóxicos do Diuron e que alterações no sistema imunológico podem afetar a integridade do organismo levando ao desenvolvimento de doenças, no presente trabalho, objetivamos avaliar os efeitos desse herbicida sobre a atividade de macrófagos peritoneais através da avaliação do índice de fagocitose, espriamento, produção de óxido nítrico (NO) e liberação de água oxigenada (H_2O_2).

2. Material e Métodos

2.1. Animais e ambiente de experimentação

Ratos Wistar machos, com 6 semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP) foram submetidos à aclimação por 2 semanas e mantidos em gaiolas de polipropileno opacas com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, em sala com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 20 \%$), ciclo de exaustão de ar e período de luz (12/12h claro/escuro) controlados. Todos os animais receberam água filtrada e ração comercial Nuvilab-CR1 (Nuvital, PR) *ad libitum*. O manuseio dos animais e procedimentos seguiram os critérios de aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu sob o protocolo de no. .(Anexo 2)

2.2. Preparo e administração de *Mycobacterium bovis* (Onco-BCG)

Ampolas de *Mycobacterium bovis* (Onco-BCG - Instituto Butantã, SP, Brasil), uma substância classicamente reconhecida como ativadora de macrófagos peritoneais (Rappolee & Werb, 1990), foram reconstituídas em solução fisiológica estéril e administradas aos animais intraperitonealmente (i.p.). Os animais dos grupos II e VI a VIII, receberam duas doses do Onco-BCG, uma dose de 0,50 ml e a segunda de 0,25 ml, com intervalo de 5 dias entre elas, sendo a avaliação realizada após 7 dias da primeira administração (Ver Figura 1 – Delineamento experimental) (Fonseca et al., 2002, com modificação).

2.3. Preparo da ração com Diuron

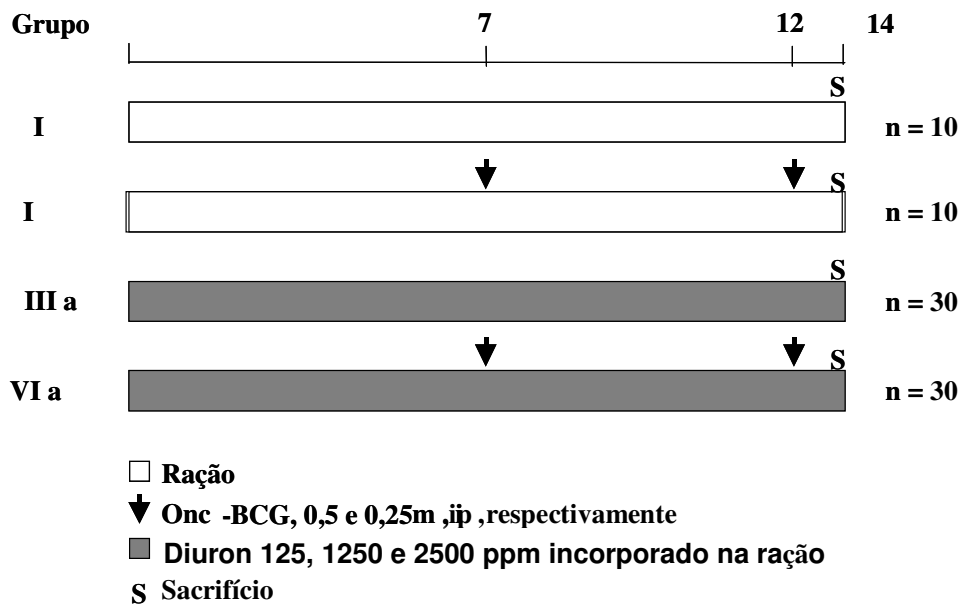
A exposição dos animais ao Diuron (CASNR 330-54-1, Sigma - EUA) foi realizada por via oral, sendo o herbicida incorporado à ração em pó (Nuvilab-CR1) nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm e, posteriormente, após completa

homogeneização (misturador Weg - Rio Claro, SP), peletizada (Peletizadora Chavantes, modelo 7,5 c.v - Chavantes, SP) e seca por ventilação.

2.4. Protocolo experimental

Os animais foram distribuídos em grupos (n = 10) conforme o Delineamento apresentado na Figura I: Grupo I: animais não-tratados que receberam ração basal; Grupo II: animais tratados com Onco-BCG que receberam ração basal; Grupos III a V: animais não-tratados que receberam ração acrescida de Diuron nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, respectivamente; Grupos VI a VIII: animais tratados com Onco-BCG que receberam ração acrescida de Diuron nas concentrações de 125, 1250 e 2500 ppm, respectivamente. Todos os grupos foram avaliados após 14 dias do início do experimento. Durante o experimento foi realizada a pesagem dos animais e registrado o consumo médio estimado de ração e de água pelos animais.

Ao final de 14 dias de experimento foram coletados macrófagos peritoneais utilizados para avaliar o índice de fagocitose e o espraçamento de macrófagos, a detecção da liberação de água oxigenada (H₂O₂) espontânea e estimulada com acetato miristato de forbol (PMA, sigla do inglês) e a produção de óxido nítrico (NO).



Figura

2.5. Obtenção das suspensões celulares

Os animais foram sacrificados em câmara com CO₂, e, em seguida, realizada a coleta dos macrófagos peritoneais mediante a inoculação de 20 ml de solução salina tamponada (PBS, pH = 7,1-7,4) gelada na cavidade peritoneal. Após o inóculo, o abdômen foi massageado cerca de 60 vezes e, com o auxílio de uma seringa, o líquido peritoneal colhido e transferido para tubos estéreis (mantidos sob refrigeração). Este procedimento foi repetido duas vezes e as suspensões celulares centrifugadas sob refrigeração por 10 minutos a 200g. As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal. A contagem dos macrófagos foi avaliada com vermelho neutro e a concentração ajustada para 2×10^6 /ml, sendo utilizadas suspensões com viabilidade acima de 90 % e predominância de macrófagos superior a 90%, quando comparados a outros tipos celulares.

2.6. Espreadimento e fagocitose

O método utilizado para estudar o efeito do Diuron sobre o espreadimento e fagocitose dos macrófagos foi baseado naquele descrito por Fonseca et al. (2002). Foram utilizados macrófagos peritoneais, obtidos conforme descrito anteriormente, de todos os grupos experimentais. Para o espreadimento de macrófagos, 200 µl de cada suspensão celular foram plaqueados em duplicata (monocamadas) em lamínulas de vidro. Vinte minutos após, os poços foram lavados com PBS gelado, adicionado 1 ml de meio RPMI 1640 e as placas incubadas a 37°C por 1 h. Após a incubação as células foram novamente lavadas com PBS gelado e as células aderentes fixadas com 0,5 % de glutaraldeído por 10 minutos. Foram contadas 200 células (redondas ou espreadas) em microscópio óptico comum na objetiva de 40 x. O índice de espreadimento foi calculado da seguinte forma:

SI = (número de macrófagos espreados x 100)/200 células aderentes, isto é, SI = % de macrófagos espreados.

Para o índice de fagocitose foi utilizado o mesmo método acima, sendo adicionado 1 mg de zimosan (2,5 mg/ml de solução) a cada poço da placa antes do

período de incubação de 1 h. O índice de fagocitose foi determinado conforme a fórmula abaixo:

IF = (número de macrófagos com atividade fagocítica x 100)/200 células aderentes, isto é, IF = % de macrófagos com partículas de zimosan fagocitadas.

Também foi avaliada a intensidade de fagocitose que consiste na contagem de quantas partículas de zimosan o macrófago fagocitou. Por exemplo, dos macrófagos que efetuaram fagocitose (mensurado anteriormente), quantos destes fagocitaram uma, duas, três ou mais partículas de zimosan.

2.7. Determinação da liberação de H₂O₂

Liberações espontâneas ou induzidas de H₂O₂ foram determinadas em monocamadas de macrófagos estimulados ou não com PMA seguindo o método descrito por Pick e Mizel (1981). Suspensões celulares obtidas conforme descrito anteriormente, na concentração de 2×10^6 /ml, foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas por 2h a 37°C. Em seguida as células não-aderentes foram removidas e a monocamada de macrófagos incubada novamente a 37°C por 24h. Após este período, o sobrenadante foi coletado e reservado para a dosagem de NO, e, à monocamada de macrófagos foi adicionado 100 µl de solução de vermelho fenol contendo 140 mM de NaCl, 10 mM de K₂HPO₄, 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho fenol e peroxidase de raiz forte tipo II (0,01 mg/ml). A reação foi interrompida 1h após o início com 10 µl de NaOH 1 M e a absorbância foi determinada em leitor Elisa a 620 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂/2 x 10⁵ células, comparando-se a D.O. de uma curva-padrão com concentrações conhecidas.

2.8. Determinação da liberação de óxido nítrico

Foi determinada em sobrenadante de cultura de macrófagos (obtido conforme descrito anteriormente) pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Para cada 50 µl do sobrenadante foi adicionado 50 µl do reagente de Griess e a absorbância das amostras foi avaliada em leitor Elisa no comprimento de onda de 540 nm. A

concentração de NO foi calculada a partir de uma curva-padrão conhecida e os níveis de absorvância expressos em $\mu\text{mols}/2 \times 10^5$ células.

2.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados pela ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. Resultados

Animais estimulados ou não com BCG e expostos ao Diuron (125, 1250 e 2500 ppm) por 14 dias apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) do espraio de macrófagos peritoneais (Figura 6).

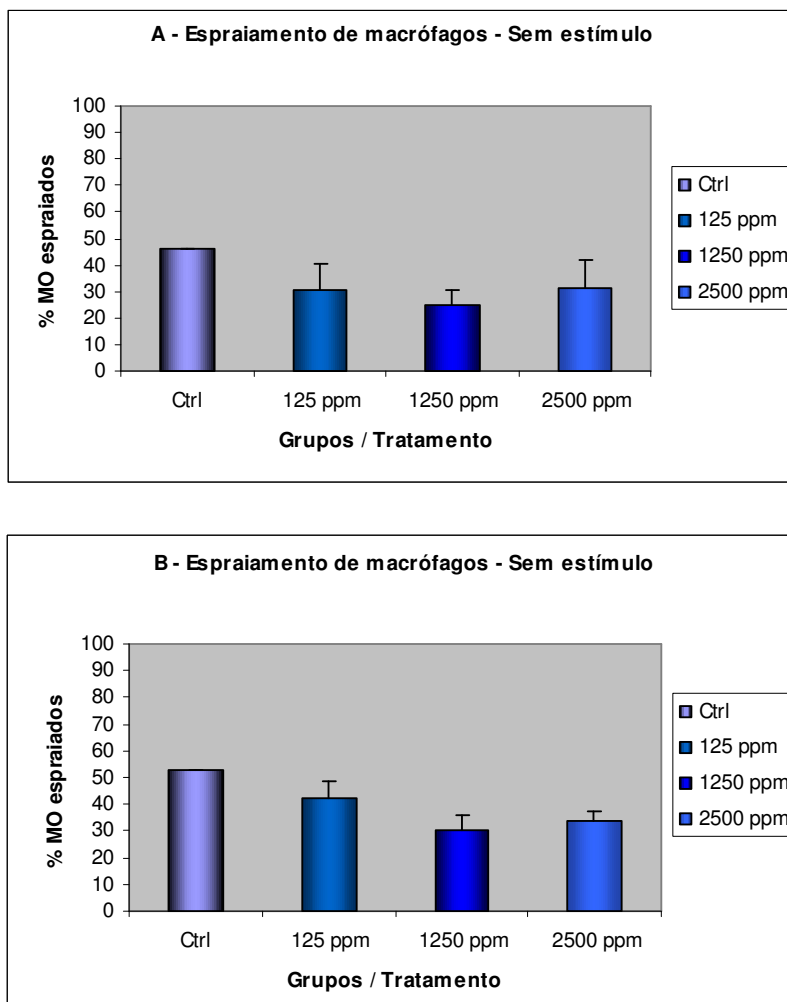


Figura 6. Espraio de macrófagos peritoneais nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG

O Diuron foi inapto a modificar o índice de fagocitose (Figura 7), a liberação de NO (Figura 8) e a liberação de H_2O_2 espontânea ou induzida por PMA (Figura 9) após exposição *in vivo* por 14 dias.

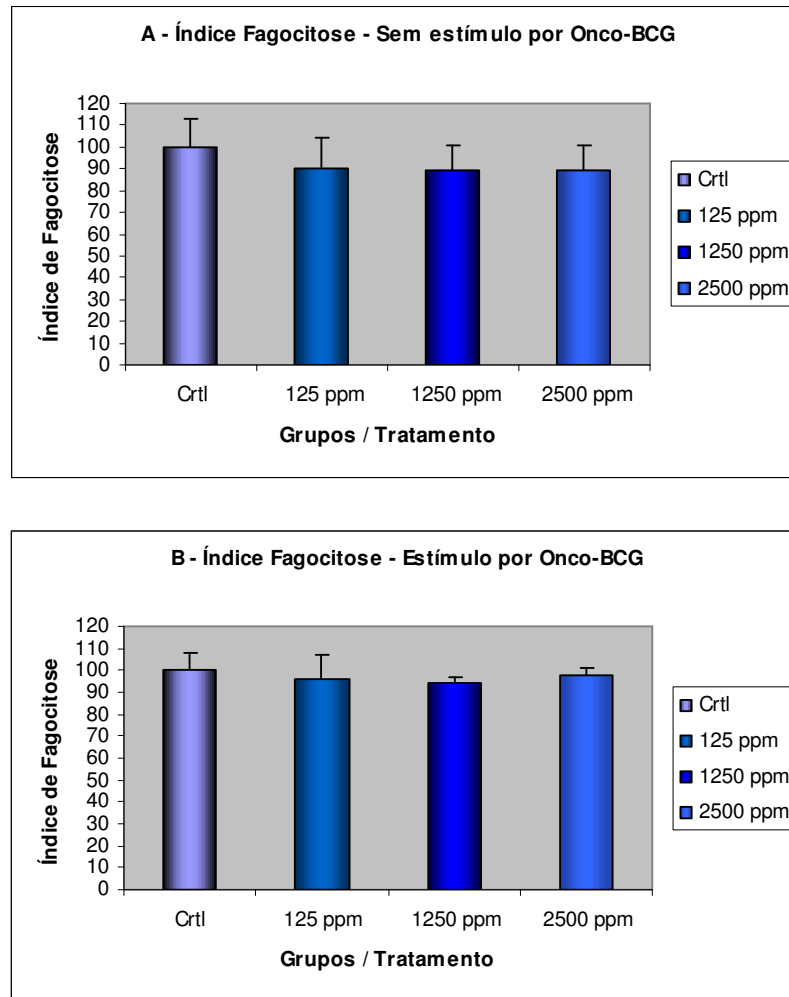


Figura 7. Avaliação do índice de fagocitose nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG

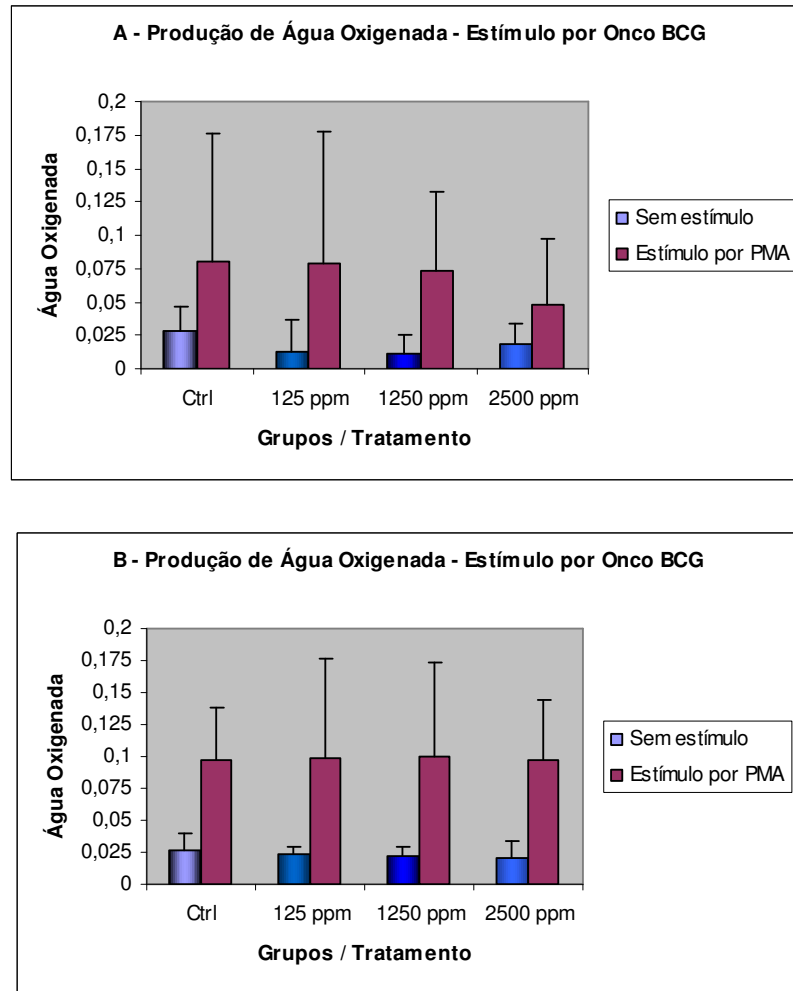


Figura 8. Produção de água oxigenada nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG

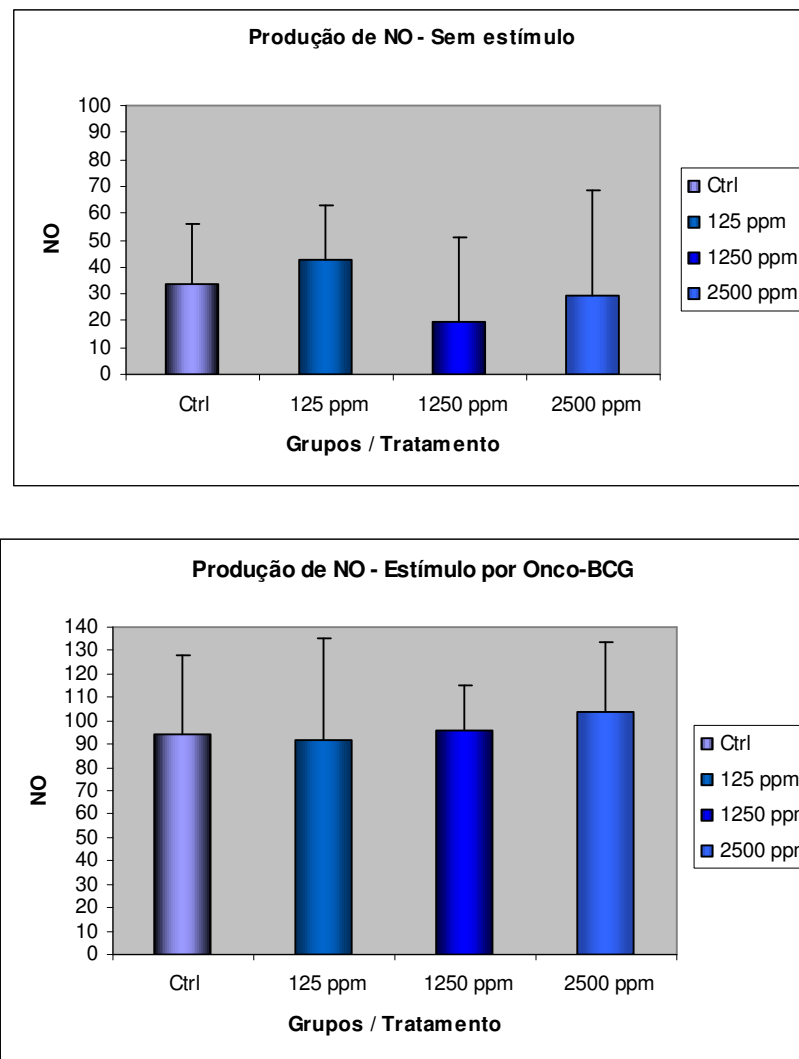


Figura 9. Produção de óxido nítrico nos grupos controle e tratados por 28 e 90 dias. A: Animais sem estímulo por Onco-BCG, B: Animais estimulados por Onco-BCG

Os resultados das análises de peso corpóreo durante 14 dias de exposição ao Diuron estão apresentados na Tabela e Figura . A exposição ao Diuron por 14 dias resultou em redução significativa ($p < 0,001$) do ganho de peso corpóreo médio nos grupos 1250 (- 11 a 38 %) e 2500 ppm (- 40 a 61 %) quando comparados aos grupos controle e 125 ppm (Tabela 10). Os consumos de água e de ração não foram alterados neste período.

Tabela 10. Peso corpóreo inicial, final e ganho¹ de animais controles e tratados com Diuron por 14 dias.

Tratamento	n ^o efetivo de animais	Peso Corpóreo (g)			Ganho Relativo ²
		Inicial	Final	Ganho	
Sem BCG					
Controle	10	221,6	287	65,4 ± 9,19	---
125 ppm	10	226,2	295	69 ± 17,25	5,5 %
1250 ppm	10	215,7	273,6	57,9 ± 0,42	-11,47%
2500 ppm	10	200	239,4	39,4 ± 2,55	-39,75%
Com BCG					
Controle	10	217,9	288,6	70,70 ± 10,63	---
125 ppm	10	219	283,6	64,60 ± 12,26	- 9,0 %
1250 ppm	10	215,5	259,5	44,00 ± 6,04	- 38,0 %
2500 ppm	10	216,5	244	27,50 ± 11,25	- 61,0 %

¹valores expressos em média ± desvio-padrão; ²porcentagem relativa ao grupo controle (Ganho de peso corpóreo do grupo tratado x 100 / ganho de peso corpóreo do grupo controle); letras indicam as diferenças significativas entre os grupos.

4. Discussão

Na Literatura os estudos reprodutivos mostram que o Diuron apresenta atividade fetotóxica (Khera., 1979; EPA, 1987; Fernandes, 2007). Quanto ao potencial de carcinogenicidade e mutagenicidade os dados são controversos. O Diuron apresentou atividade mutagênica em alguns testes (Seiler, 1978; Anon,1987, Agrawal & Mehrotra, 1997,Dupont de Nemours, 1985) e atividade cancerígena principalmente para mama e bexiga de roedores (Bayer, 1985 *apud* USEPA, 1997; Anon, 1987; Iyer, 2002, Nascimento et al., 2006). Quanto ao seu potencial imunotóxico há poucos trabalhos na Literatura. Um estudo *in vitro* utilizando-se células mononucleares de sangue periférico humano de doadores normais mostrou que o Diuron administrado às culturas nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM, inibiu a produção de IL-5, IFN- γ e TNF- α (Hooghe et al., 2000). Ratas expostas às doses de 250-1000 mg/kg de Diuron na dieta por 14 meses apresentaram aumento do peso do baço, aumento de hemosiderina e formação de aductos de hemoglobina com aminas aromáticas liberadas do herbicida (Wang et al., 1993). Neste contexto, este é o primeiro estudo que avalia o efeito do Diuron sobre a atividade de macrófagos.

Estudo recente realizado por nosso grupo mostrou que Diuron exerce efeito tóxico órgão-específico, afetando principalmente o baço. Em tal estudo foi observado esplenomegalia, hiperplasia eritróide, aumento de hemosiderina e hematopoiese extramedular. Além disso, foi observada diminuição dos compartimentos de polpa branca e da celularidade do baço principalmente da bainha linfocítica periarteriolar (PALS) associada a diminuição dos linfócitos T CD4⁺. Devido a complexidade do sistema imunológico, uma bateria de testes imunológicos foi desenvolvida para determinar o potencial imunossupressor de compostos (Gore, 2006). Desta forma, este

estudo foi desenvolvido para verificar o papel do Diuron sobre a atividade de macrófagos. O potencial imunotóxico do Diuron em ratos machos foi avaliado pela análise da atividade fagocítica, incluindo espraiamento, índice e intensidade de fagocitose, liberação de NO e H₂O₂ espontânea ou estimulada com PMA.

Os resultados do presente estudo mostram que o Diuron diminui o espraiamento de macrófagos sem alterar o índice de fagocitose e a liberação de NO e H₂O₂, após 14 dias de exposição *in vivo*. A eficiência do estímulo com BCG foi significativa tanto para o espraiamento como para a fagocitose mostrando índices de ativação maiores em relação aos animais não-estimulados. O número de macrófagos obtidos após o estímulo com BCG representaram 90 % das células do lavado peritoneal, cujos dados estão de acordo com aqueles relatados anteriormente por Rigui e Palermo-Neto (2005).

A ativação de macrófagos vem sendo estudada há várias décadas (Adams & Hamilton, 1984; Arai et al., 1990; Massoco & Palermo-Neto, 2003). Este processo de ativação é caracterizado por alterações morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparado às células não-ativadas. Os macrófagos ativados constituem um componente chave da resposta imunológica celular, uma vez que estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos para as células linfóides. O espraiamento é um processo ativo que representa uma das alterações ocorridas durante a ativação de macrófagos. Embora seu papel na fagocitose possa ser controverso, vários estudos recentes têm mostrado diferenças no espraiamento (Rigui & Palermo-Neto, 2005). Nossos dados mostram que a exposição ao Diuron diminui o espraiamento nas três concentrações em animais estimulados ou não com BCG, após 14 dias. Por outro lado, a fagocitose e a liberação de NO e H₂O₂ não foram alteradas.

Embora tenha sido observada redução significativa do ganho de peso corpóreo sugerindo toxicidade sistêmica em decorrência da exposição ao Diuron, o tratamento

não modificou a atividade de macrófagos peritoneais. Como não foi observada formação de rosetas eritrocitárias, é possível inferir que os macrófagos estão realizando sua atividade normal de fagocitose.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o Diuron não afeta a atividade de macrófagos peritoneais após exposição *in vivo* por 14 dias.

Referências

1. Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 1984; 2:283-318
2. Agrawal RC, Mehrotra NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Indian J. Exp. Biol.* 1997; 35:1256.
3. Anon D. *Proper. Ind. Mater. Report.* 1987; 7 : 49.
4. Arai S, et al. Enhancement of cytotoxicity of active macrophages by mycoplasma: role of mycoplasma-associated induction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in macrophages. *Microbiol Immunol.* 1990;34:231-43.
5. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology. 1985 (DPR # 106-035).
6. Dean, JH, Cornacoff, JB, Rosenthal, GJ, Luster MI. Immune system: Evaluation of injury. *Principles and Methods of Toxicology* .A. W. Hayes, Ed. 1989, p 741-760. Raven Pres, New York
7. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Increased incidence of malignant and combined malignant and benign tumors in male and female rats and increased incidence of malignant tumors in female mice. 1987
8. Fernandes GS, et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol.* 2007;23(1):106-12.
9. Fonseca ES, Massoco CO, Palermo-Neto J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiol Behav.* 2002;77(2-3):205-15.

10. Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of Diuron transformation: a review. *Chemosphere*. 2004; 56(11): 1021-32.
11. Gore ER. Immune function tests for hazard identification: a paradigm shift in drug development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(4):331-5.
12. Grassi, T. Avaliação da carcinogenicidade do pesticida Diuron em modelo de carcinogênese de média duração para o fígado de ratos Wistar machos. Tese de Mestrado. 2006
13. Hayes WJ Jr. Pesticides studied in man. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1982; p. 672.
14. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe EL Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences*. 2000; 66:2519-2525.
15. Khera .S, Whalen C, Trivett G, Ongers G. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 1979; 22: 522.
16. Massoco C, Palerm—Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003;95(1-2):11-9.
17. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):211-26.
18. Righi DA, Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. *Toxicology*. 2005 Sep 1;212(2-3):98-106
19. Schoket B., Vincze I. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *Acta pharmacol. et toxicol*. 1985; 56:283-288.
20. Seiler J.P. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat. Res*. 1978; 58: 353.

21. Wang SW, Chu C.Y, Wang C.J. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 1993; 31:285-295.

1. Agrawal RC, Mehrotra NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Indian J. Exp. Biol.* 1997; 35:1256.

2. Anon D. Proper. *Ind. Mater. Report.* 1987; 7 : 49.

3. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology. 1985 (DPR # 106-035).

4. Dean, JH, Cornacoff, JB, Rosenthal, GJ, Luster MI. Immune system: Evaluation of injury. *Principles and Methods of Toxicology* .A. W. Hayes, Ed. 1989, p 741-760. Raven Pres, New York

5. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Increased incidence of malignant and combined malignant and benign tumors in male and female rats and increased incidence of malignant tumors in female mice. 1987

6. Fernandes GS, et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol.* 2007;23(1):106-12.

7. Fonseca ES, Massoco CO, Palermo-Neto J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiol Behav.* 2002;77(2-3):205-15.

8. Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of Diuron transformation: a review. *Chemosphere*. 2004; 56(11): 1021-32.
9. Grassi, T. Avaliação da carcinogenicidade do pesticide Diuron em modelo de carcinogênese de média duração para o fígado de ratos Wistar machos. Tese de Mestrado. 2006
10. Hayes WJ Jr. Pesticides studied in man. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1982; p. 672.
11. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe EL Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sciences*. 2000; 66:2519-2525.
12. Khera .S, Whalen C, Trivett G, Ongers G. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 1979; 22: 522.
13. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):211-26.
14. Righi DA, Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. *Toxicology*. 2005 Sep 1;212(2-3):98-106
15. Schoket B., Vincze I. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *Acta pharmacol. et toxicol*. 1985; 56:283-288.
16. Seiler J.P. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat. Res*. 1978; 58: 353.
17. Wang SW, Chu C.Y, Wang C.J. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol*. 1993; 31:285-295.

