



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafaela Marono Fava

**ESTUDO DE CARCINOGENICIDADE DO
DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E
TRANSCRICIONAIS INDUZIDAS NO
UROTÉLIO DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Patologia.

Orientadora: Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira
Coorientadora: Dra. Merielen Garcia Nascimento e Pontes

**BOTUCATU
2018**

Rafaela Marono Fava

**ESTUDO DE CARCINOGENICIDADE DO
DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS
E TRANSCRICIONAIS INDUZIDAS NO
UROTÉLIO DE RATOS WISTAR**

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em
Patologia.

Orientadora: Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira
Coorientadora: Dra. Merielen Garcia Nascimento e Pontes

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Marono Fava, Rafaela.

Estudo de carcinogenicidade do diuron : alterações morfológicas e transcricionais induzidas no urotélio de ratos / Rafaela Marono Fava. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira
Coorientador: Merielen Garcia Nascimento e Pontes
Capes: 40105008

1. Citotoxicidade. 2. Diuron. 3. Expressão gênica. 4. Hiperplasia.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Diuron; Expressão gênica; Hiperplasia; Urotélio.

Dedicatória

*À minha filha Micaela, com todo o meu amor.
Obrigada por confiar em mim e me permitir ser uma
pessoa melhor.*

*“Não ame pela beleza, pois um dia ela acaba. Não ame
por admiração, pois um dia você se decepciona. Ame
apenas, pois o tempo nunca pode acabar com um amor
sem explicação! ”*

(Chico Xavier)

Agradecimientos

À Deus pois sem ele nada existiria.

Ao Álvaro, com todo meu carinho, pelo amor, incentivo e convivência de cada dia e principalmente por confiar que eu era capaz.

Aos meus pais Marisa e Wagner, os quais amo muito, por todo amor e dedicação.

À Manilda e Wisley, pessoas essenciais na minha vida, sem os quais não seria quem sou hoje.

Aos meus queridos avós: Flávia, Luiz e Remy que mesmo não estando mais presentes fisicamente em minha vida me acompanham sempre em meu coração.

Ao meu avô Moacyr por todo amor e dedicação.

Aos meus sogros Neusa e Álvaro pelo carinho e apoio indispensável.

Ao meu querido amigo Ernani, o qual amo muito, obrigada por nos deixar fazer parte da sua família.

Às minhas queridas amigas: Nathália, Carol e Guiomar, pela amizade e por todos os momentos fantásticos que passamos juntas, obrigada por serem muitas vezes o meu porto seguro.

À Buzuza, Viviane, Ana Paula e Lígia, que foram embora e deixaram muita saudade.

Aos amigos do laboratório Toxicam: Paulo, Cristina, Lilian, Carla, Gabi, Thania, Bianca, Osvaldo e Isabela pela amizade e anos de convivência.

Aos meus queridos amigos Rafa e Babi pela linda amizade construímos.

À Shadia, pelas valiosas considerações para o trabalho.

Ao Rodrigo pela grande ajuda com os procedimentos de biologia molecular.

Ao Dr. Samuel Cohen pelas considerações e revisão do manuscrito em inglês.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, IBB- Unesp, onde foi realizada parte do trabalho.

Ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências da Unesp Bauru. Em especial ao Dr. Fábio Bossoi Vicente pela disposição e ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2015/11628-6), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro (Bolsa de doutorado processo nº 14306/2014-5).

Ao Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana, TOXICAM, pelo suporte na realização deste trabalho.

Ao Departamento Programa de pós-graduação em Patologia, pelo suporte financeiro.

Aos amigos do departamento de Patologia pelo carinho e acolhimento.

Agradecimentos especiais

À Dra. Maria Luiza, que nesses anos de convivência foi muito mais que uma professora para mim! Obrigada pelo carinho, confiança e dedicação. Sem você eu não teria conseguido.

Ao Dr. João Lauro pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação a ciência.

À Dra. Merielen pela amizade, carinho e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

PARTE I

REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 CARCINOGENESE UROTELIAL: EPIDEMIOLOGIA E ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO	14
1.2 DIURON.....	16
1.3 DOSE-RESPOSTA DO DIURON: ALTERAÇÕES TRANSCRIPÇIONAIS:	18
1.4 ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>TGFB1</i> , <i>GPC3</i> , <i>UGT1A6</i> , <i>NFE212</i> E <i>GSTM1</i> APÓS EXPOSIÇÃO À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DIURON	20
1.5 DOSE-RESPOSTA DO DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	27
1.6 JUSTIFICATIVA	28
2.0 REFERÊNCIAS:	31

PARTE II

MANUSCRITO:	36
1.0 ABSTRACT	39
2.0 ABBREVIATIONS	40
3.0 INTRODUCTION	41
4.0 MATERIAL AND METHODS	44
4.1 ANIMAL EXPOSURE AND SAMPLE COLLECTION	44
4.2 MORPHOLOGICAL ANALYSES.....	47
4.3 RNA EXTRACTION, CDNA PREPARATION AND REAL TIME PCR	48
6.0 DISCUSSION	54
7.0 CONCLUSIONS.....	59
8.0 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	60
9.0 FUNDING	61
10 ACKNOWLEDGEMENTS	62
11. REFERENCES	63
12. TABLES	67
13. FIGURES	69
APÊNDICES	73
ANEXOS.....	82

Parte I

RESUMO

O Diuron (3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilureia), herbicida derivado da ureia, induziu tumores uroteliais na bexiga de ratos Wistar após dois anos de exposição à alta concentração (2500ppm). Estudos sucessivos de nosso laboratório sugeriram que a concentração intermediária de 500ppm na ração poderia ser citotóxica e potencialmente cancerígena ao urotélio de ratos. A proposta deste estudo foi avaliar as alterações uroteliais induzidas pela exposição subcrônica e crônica (20 e 84 semanas, respectivamente) ao diuron na concentração de 500ppm. Cento e trinta e dois ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos controle ou diuron e avaliados após 20 ou 84 semanas de exposição. Os rins e as bexigas foram processados para análise histológica, as bexigas para análise de microscopia eletrônica de varredura e para avaliação da expressão dos genes *Gpc3*, *Ugt1a6*, *Nfe2l2*, *Tgfb1* e *Gstm1* por RT-PCR quantitativo em tempo real. Apenas após 84 semanas de exposição, a incidência de hiperplasia simples foi significativamente maior na bexiga urinária (10/18) e na pelve renal (23/25) nos animais expostos ao diuron quando comparado aos do grupo controle (2/22 e 9/30, respectivamente). Em ambos os períodos de exposição, o diuron induziu diminuição de expressão do gene *Gpc3*, envolvido na proliferação celular, e aumento de expressão do gene *Ugt1a6*, relacionado com o metabolismo de xenobióticos. A expressão do gene *Nfe2l2*, relacionado ao estresse oxidativo, aumentou apenas no período de 20 semanas. Neste estudo, embora na 20ª semana a concentração de diuron 500ppm tenha se comportado morfológicamente como nível de efeito adverso não observável (NOAEL), as alterações na expressão gênica mostraram perturbações relacionadas à proliferação celular, estresse oxidativo e metabolismo de xenobióticos. Nossos resultados sugerem que a exposição dietética ao diuron 500ppm por um longo período foi citotóxica, suficiente para a indução de alterações transcricionais e para o desenvolvimento de hiperplasia urotelial, podendo ser considerada como o menor nível de efeito adverso observável (LOAEL) para exposição crônica em ratos.

Palavras-chave: Diuron, bexiga, urotélio, hiperplasia, citotoxicidade, expressão gênica.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CARCINOGENESE UROTELIAL: EPIDEMIOLOGIA E ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO

A relação entre exposição a agentes químicos e o desenvolvimento de câncer de bexiga é reconhecida desde 1895, quando o médico alemão Rehn verificou que trabalhadores da indústria de corantes expostos a aminas aromáticas possuíam maior risco para o desenvolvimento deste tumor (Dietrich & Dietrich, 2001). Sabe-se que o aparecimento desta doença está relacionado também a outros fatores e.g. tabagismo, exposição a componentes ambientais e ocupacionais, fatores genéticos e estilo de vida (Crawford, 2008; Burger et al., 2013). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que no Brasil, no ano de 2018, 6.690 homens e 2.790 mulheres desenvolverão câncer de bexiga. Neste cenário, os modelos experimentais de carcinogênese urotelial *in vivo* e *in vitro* podem auxiliar na identificação de fatores de riscos (Oliveira et al., 2006; Cohen et al., 2007), modos de ação cancerígeno (Meek et al., 2013; da Rocha et al., 2014) e, também, na caracterização de marcadores associados com o desenvolvimento dessa neoplasia (De Graff et al, 2011), subsidiando medidas de intervenção para a redução de sua incidência e contribuindo para definição de prognósticos.

Ainda que os testes *in vitro* permitam a avaliação do potencial toxicológico de substâncias químicas de forma rápida e acessível (Liest et al., 2014), possuem limitações relevantes, principalmente relacionadas com o

Revisão de Literatura

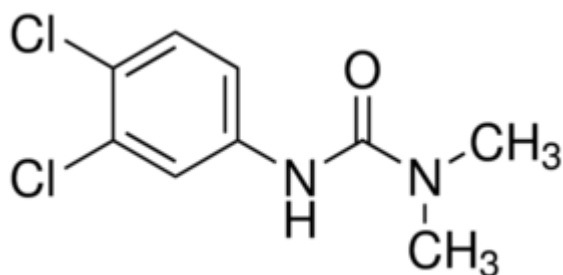
metabolismo e farmacocinética da substância teste (Coecke et al., 2006; McMullen et al., 2018). Além disso, os testes *in vitro*, quando realizados com monocamadas de células, não reproduzem a complexidade real de um organismo biológico, pois o desenvolvimento neoplásico *in vivo* depende dos tecidos e células adjacentes, como células mesenquimais, elementos vasculares e matriz celular (Hartung & Daston, 2009; De Graff et al., 2012). Por isso, embora várias alternativas *in vitro* de toxicidade dérmica e ocular já sejam utilizadas para fins de regulamentação, ainda não existem alternativas *in vitro* adequadas e aceitas para os outros órgãos/sistemas e.g. sistema urinário, gastrointestinal e cardiovascular (McMullen et al., 2018).

Substâncias químicas conhecidamente cancerígenas para os seres humanos, quando testadas adequadamente em animais de experimentação mostraram resultados positivos para a avaliação do potencial cancerígeno em pelo menos um dos protocolos propostos por agências como a OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) (Faustman & Omenn, 2008). Apesar do esforço empregado pelos pesquisadores no desenvolvimento de testes toxicológicos alternativos (Sparrow et al., 2011; Liest et al., 2014; McMullen et al., 2018), os bioensaios conduzidos com animais de experimentação ainda são amplamente utilizados pelas principais agências regulatórias do mundo fornecendo informações importantes sobre o modo de ação, doses de referência e principais efeitos biológicos induzidos por um agente químico (McMullen et al., 2018).

1.2 DIURON

O diuron [3 - (3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilureia] (CAS 330-54-1) (Figura 1) é um herbicida derivado da ureia amplamente empregado em diversas culturas agrícolas como cana de açúcar, algodão, café, frutas cítricas, uva, cacau, alfafa, aspargos, entre outras (Roque & Melo, 2000; USEPA, 2003; APVMA, 2005). Devido suas propriedades físico-químicas, possui elevada persistência no solo, podendo permanecer no ambiente por até um ano, o que possibilita sua dispersão por lixiviação, contaminação de ambientes aquáticos e de fontes de abastecimento de água (Field et al., 2003; Okamura et al., 2003).

Figura 1: Fórmula molecular do diuron



Em estudo de carcinogenicidade, ratos Wistar de ambos os sexos alimentados com diuron na concentração de 2500ppm durante dois anos apresentaram aumento das incidências de papilomas e carcinomas uroteliais na pelve renal e bexiga (USEPA, 1997; Iyer, 2002). Consequentemente, o diuron foi classificado pela *U.S. Environmental Protection Agency* como “provável cancerígeno para a espécie humana” (USEPA, 1997).

Revisão de Literatura

Estudos experimentais mostraram ultraestruturalmente presença de células inchadas representando degeneração celular no urotélio da bexiga de ratos após um dia de exposição ao diuron 2500ppm (da Rocha et al., 2012) e, a partir de 15 semanas, alterações uroteliais mais proeminentes como hiperplasia simples, focos de necrose e aumento do índice de proliferação celular (Nascimento et al., 2006; da Rocha et al., 2010; Ihlaseh et al., 2011; Cardoso et al., 2013; Fava et al., 2015).

O diuron é um composto não genotóxico, ou seja, a indução de lesões uroteliais pela exposição a este herbicida não está relacionada com processos de interação com o DNA (Iyer, 2002; USEPA, 2003; APVMA, 2005; Nascimento et al., 2006, da Rocha et al., 2010). Alterações na composição da urina como pH, presença de precipitados e cristais também não fazem parte do processo de toxicidade induzido por este herbicida (da Rocha et al., 2010).

Após ingestão, o diuron é absorvido pelo sistema gastrointestinal e extensivamente metabolizado e excretado na urina (Iyer, 2002; da Rocha et al., 2014). Assim, o modo de ação (MOA) pelo qual o diuron induz lesões no urotélio do rato a altas doses envolve ativação para metabólitos tóxicos, principalmente N-(3,4-dichlorofenil) ureia (DCPU) e em menor quantidade 4,5-dichloro-2-hidroxifenil ureia (2-OH-DCPU) que concentrados na urina induzem citotoxicidade, degeneração celular, esfoliação e necrose seguidas de hiperplasia regenerativa e eventualmente formação de tumores (da Rocha et al., 2010, 2012, 2013, 2014). Em humanos, um relato de abuso de ingestão

do diuron, o principal metabólito presente na urina era o N-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU), seguido de pequenas quantidades de DCPU e de 3,4-dicloroanilina (DCA) (Boven et al., 1990). A avaliação *in vitro* da toxicidade desses metabólitos mostrou que o DCA, uma amina aromática que tem como órgãos alvos fígado, rim e bexiga, era o metabólito mais reativo para as células uroteliais humanas (1T1) (Valentovic et al., 1997), enquanto que nas células uroteliais de ratos (MYP3), o metabólito que apresentou maior toxicidade foi o DCPMU (da Rocha et al., 2013). Embora o DCA seja o metabólito reativo formado no homem em menor quantidade após a exposição ao diuron, não é possível excluir a hipótese de que esse composto possa induzir o desenvolvimento de lesões uroteliais importantes em indivíduos expostos continuamente a altas concentrações.

1.3 DOSE-RESPOSTA DO DIURON: ALTERAÇÕES TRANSCRISSIONAIS:

A avaliação do perfil global da expressão gênica de células uroteliais da bexiga de ratos expostos por sete (07) dias pela ração ao diuron nas concentrações de 60, 125, 500, 1250 e 2500ppm mostrou uma evidente separação entre o grupo de alta concentração (2500ppm) com os de baixas concentrações (125ppm e 500ppm). Essa relação de dose-resposta culminou com um aumento do número de genes diferencialmente expressos na maior concentração, a de 2500ppm (Ihlaseh-Catalano et al., 2014). A maioria desses genes tem sido relacionados com funções de interações célula-a-célula e

Revisão de Literatura

desorganização tecidual, eventos críticos importantes para o desenvolvimento da carcinogênese urotelial (Sanchez-Carbayo et al., 2003) e possivelmente associados com as alterações morfológicas induzidas pela exposição ao diuron neste período (Ihlaseh-Catalano et al., 2014).

A relação dose-resposta também foi observada após 20 semanas de exposição, quando o perfil de expressão gênica das altas doses (1250ppm e 2500ppm) apresentou-se diferente daquele expresso nas concentrações menores (60ppm e 125ppm) e no grupo controle (Ihlaseh et al., 2011). Nesse período, as concentrações de 1250 e 2500ppm induziram alteração da expressão gênica que incluíam efeitos sobre o metabolismo de aminoácidos, lipídios e maior resposta ao estresse oxidativo possivelmente associadas à sustentação da hiperplasia urotelial observada nesse período (Ihlaseh et al., 2011).

1.4 ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO DOS GENES *Tgfb1*, *Gpc3*, *Ugt1a6*, *Nfe212* e *Gstm1* APÓS EXPOSIÇÃO À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DIURON

Estudo anterior realizado por nosso grupo, em que ratos Wistar machos foram expostos a diferentes concentrações de diuron (60, 125, 500, 1250 e 2500ppm) no período de sete (7) dias mostrou que 74% dos genes diferencialmente expressos em 500ppm também estavam alterados em 2500ppm. Digno de nota, o fator transformador de crescimento beta 1 (*Tgfb1*) foi considerado o mais relevante regulador da resposta transcricional desses grupos, tendo sido responsável pela regulação da expressão de 125 genes (17,5%) no grupo 2500ppm (Ihlaseh-Catalano et al., 2014). Contudo, não houve alteração na expressão desse gene após 20 semanas de exposição, sugerindo que sua função está relacionada aos processos de toxicidade precoces induzidos por este herbicida (Ihlaseh et al., 2011).

As proteínas codificadas pelos genes *Tgfb* estão envolvidas em vários processos biológicos como: regulação da proliferação celular, resposta imune, crescimento, diferenciação, angiogênese e apoptose (Narayan et al., 2005; Kajdaniuk et al., 2013). Devido a sua alta complexidade, o exato papel dessas proteínas no desenvolvimento cancerígeno ainda não foi completamente elucidado. Enquanto alguns estudos demonstram associação positiva entre o aumento da sinalização do *Tgfb* e a supressão do crescimento tumoral através da indução de apoptose (Al-Azayzih et al., 2012; Wang et al., 2018), outros sugerem que o aumento da expressão de vias de

sinalização desse gene pode contribuir para a progressão tumoral através de mecanismos como indução da transição epitelial-mesenquimal e aumento de motilidade, invasividade e metástase de células cancerosas (Amatangelo et al., 2012; Geng et al., 2014; Zhang et al., 2016). De modo geral, a importância do gene *Tgfb* em carcinomas uroteliais humanos tem sido amplamente descrita na literatura (Tzong-Tyng et al., 2008; Al-Azayzih et al., 2012; Olfat-Shaker et al., 2013; Geng et al., 2014). Essas informações sugerem uma provável associação entre a indução de alterações transcricionais reguladas por *Tgfb1* detectadas nas células uroteliais de ratos expostos ao diuron por sete dias (Ihlaseh-Catalano et al., 2014) com a degeneração celular visualizada à microscopia eletrônica de varredura após o mesmo período de exposição (da Rocha et al., 2012; Fava et al., 2015).

O gene Glipican 3 (*Gpc3*), proteoglicano ligado à superfície exocitoplasmática da membrana celular por um eixo glicosil-fosfatidinositol (GPI), está envolvido no processo de proliferação celular e, possivelmente, na indução de apoptose (Gonzalez et al., 1998; Cano-Gauci et al., 1999). Em mamíferos, as proteínas da família *glipican* podem ser classificadas em seis (6) subtipos diferentes (*Gpc1-Gpc6*) (Filmus et al., 2008; Fico et al., 2011). Evidências *in vivo* indicam que as principais funções dessas proteínas estão relacionadas à regulação de fatores de crescimento de fibroblastos e sinalização de vias *Wnt* e *Hedgehog* (Filmus & Capurro, 2013). O aumento e/ou diminuição da expressão do gene *Gpc3* tem sido associado à diversos

Revisão de Literatura

tipos de tumores e.g. mama (Tascón et al., 2016), colangiomas (Man et al., 2005), mesoteliomas (Murthy et al., 2000) hepatocelulares (Saber et al., 2017), embrionários como neuroblastoma, meduloblastoma e tumor de Wilms (Saikali & Sinnett, 2000) e de cólon (Foda et al., 2015). Essa variação de expressão do *Gpc3* em diferentes tumores ocorre provavelmente devido ao fato desse gene comportar-se em alguns tecidos como uma proteína oncofetal (ex: intestino e fígado), expressando-se apenas na fase embrionária e tornando-se silenciada nos tecidos adultos normais, podendo, entretanto, reaparecer durante a transformação maligna tumoral (Filmus et al., 2001; Xylinas et al., 2014; Foda et al., 2015). A expressão da proteína *Gpc3* também foi descrita em carcinomas uroteliais e escamosos na bexiga de humanos (Gailey et al., 2013). Estudo prévio em nosso laboratório mostrou diminuição de expressão do gene *Gpc3* no urotélio de ratos expostos a diferentes concentrações de diuron no período de sete dias (125, 500 e 2.500ppm) ou 20 semanas (60, 125, 1.250 e 2.500ppm) (Gomide et al., em submissão).

O processo de metabolização do diuron ocorre por desmetilação, hidroxilação do anel aromático, N-oxidação, declorinação e conjugação com ácido glicurônico (APVMA, 2011). As reações de conjugação com o ácido glicurônico ou com a glutatona representam importantes vias de biotransformação em mamíferos com principal objetivo de facilitar a excreção de compostos lipossolúveis tornando-os moléculas mais hidrofílicas (Rowland et al., 2013; Ouzzine et al., 2014). Em ratos, as enzimas UDP-

Revisão de Literatura

glicuronosiltransferases (*Ugts*), responsáveis pela catalisação da reação de conjugação de substratos tóxicos com o ácido glicurônico, podem ser separadas em duas famílias de genes: as *Ugt1* e as *Ugt2* (Bock & Kohle, 2005; Klaassen & Watkins III, 2012). De modo geral, alterações de expressão e/ou polimorfismos nos genes da família *Ugt1* foram descritos em diversos tipos de tumores humanos (cólon, estômago, fígado e bexiga) (Strassburg et al., 1997, 1998; Giuliani et al., 2001, 2005). Particularmente, a baixa regulação do gene *Ugt1a6* está relacionada com maior susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de bexiga em humanos (Giuliani et al., 2005; Sundararaghvan et al., 2017) e em camundongos (Iida et al., 2010). A baixa expressão desse gene também foi observada nas células uroteliais da bexiga de ratos após exposição ao diuron 60 e 125ppm por 20 semanas (Ihlaseh et al., 2011).

As glutathione-S-transferases (*Gsts*) constituem uma superfamília de enzimas de Fase II com importante papel na proteção do organismo contra substâncias químicas potencialmente tóxicas como pesticidas, agentes antitumorais, poluentes ambientais, entre outras (Hayes & Pulford, 1995; Kang et al., 2013). Em humanos, as enzimas dessa família podem ser distribuídas em cinco classes diferentes: α , μ , π , Σ ou ϑ , cada uma delas tendo um substrato de ligação específico (Hayes & Pulford, 1995). Genótipos nulos ou polimorfismos do gene *Gstm1*, importante membro da classe μ envolvido no processo de detoxificação de vários agentes cancerígenos

foram associados a diversos tipos de tumores humanos tais como os de mama (Chirilă et al., 2014), estômago (Meng et al., 2014; Gu et al., 2014), pulmão (Pan et al., 2014) e bexiga (García-Closas et al., 2005; Lukas et al., 2017). Além disso, estudo conduzido por nosso grupo detectou um aumento de expressão do gene *Gstm1* nas células uroteliais de ratos alimentados com diuron nas concentrações de 1.250 e 2.500ppm por 20 semanas (Ihlaseh et al., 2011).

Enquanto alguns estudos mostram ausência de relação entre a expressão diferencial e/ou polimorfismos dos genes *Gsts* e o desenvolvimento de câncer de bexiga (Matic et al., 2013; Safarinejad et al., 2013), outros afirmam que genótipos nulos do gene *Gstm1* estão diretamente relacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento de tumores uroteliais (Lukas et al., 2017) e que a diminuição da expressão está associada à maior susceptibilidade de progressão para carcinomas uroteliais músculo-invasivos em humanos (Kang et al., 2013). Apesar das enzimas *Gsts* não participarem diretamente do processo de metabolização do diuron, elas desempenham importante papel na proteção do organismo contra o estresse oxidativo (Hayes & Pulford, 1995; Aquilano et al., 2014). Isto é relevante, uma vez que a indução de lesões uroteliais induzidas pela exposição ao herbicida diuron ocorra também devido as interações das espécies reativas de oxigênio (EROS) com as células epiteliais (Ihlaseh et al., 2011). Neste contexto, é importante ressaltar que o estresse oxidativo exerce duplo papel no

Revisão de Literatura

desenvolvimento cancerígeno; favorecendo o desenvolvimento tumoral pela instalação de danos diretos em macromoléculas (ex: lipídio, proteína, ácidos nucleicos) e por induzir vias que promovem a carcinogênese (Klaunig et al., 2010) ou ainda, exercendo supressão tumoral pela indução de apoptose de células neoplásicas (Mena et al., 2009, Shibata et al., 2010) e proteção do organismo contra o desenvolvimento de metástases (Moon et al., 2014).

Neste cenário, destaca-se a atividade do fator de transcrição *Nfe2l2*, importante regulador de genes com funções detoxificantes contra EROS (Reszka et al., 2014), envolvido no processo de regulação de enzimas de Fase II (ex: *Gstm* e *Gst*) (Iida et al., 2007). Mutações simultâneas dos genes *Nfe2l2* e *p53* em camundongos resultaram em aumento significativo da incidência de carcinomas uroteliais induzidos quimicamente pelo N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN; CAS: 3817-11-6) (Iida et al., 2007). Em seres humanos, a importância desse gene foi também descrita em tumores de pulmão (Bauer et al., 2013), estômago (Kawasaki et al., 2015) e bexiga (Hayden et al., 2014). Corroborando esses dados da literatura, ratos alimentados com diuron por 20 semanas nas concentrações 60, 125, 1.250 e 2.500ppm apresentaram aumento de expressão de transcritos relacionados ao estresse oxidativo mediado pelo gene *Nfe2l2* (Ihlaseh et al., 2011).

De modo geral, a diminuição da síntese e/ou da atividade de proteínas com funções associadas à detoxificação de substâncias químicas,

Revisão de Literatura

como as das enzimas UDP-glicuronosiltransferases (*Ugts*) ou glutathione S-transferases (*Gst*), está relacionada com aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinomas uroteliais. A redução da atividade de enzimas detoxificantes ocasionaria elevada disponibilidade de compostos reativos na urina, permitindo maior interação com as células uroteliais, proporcionando um ambiente favorável para a instalação de citotoxicidade e desenvolvimento de lesões (Iida et al., 2007, 2010; Sundararaghvan et al., 2017). Considerando as funções protetoras do *Nfe2l2*, supõe-se que variações da expressão e/ou mutações desse gene poderiam interferir na susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões induzidas quimicamente e/ou na resistência a xenobióticos em geral.

As principais funções dos genes discutidos acima estão resumidas e ilustradas na figura 2.

Revisão de Literatura

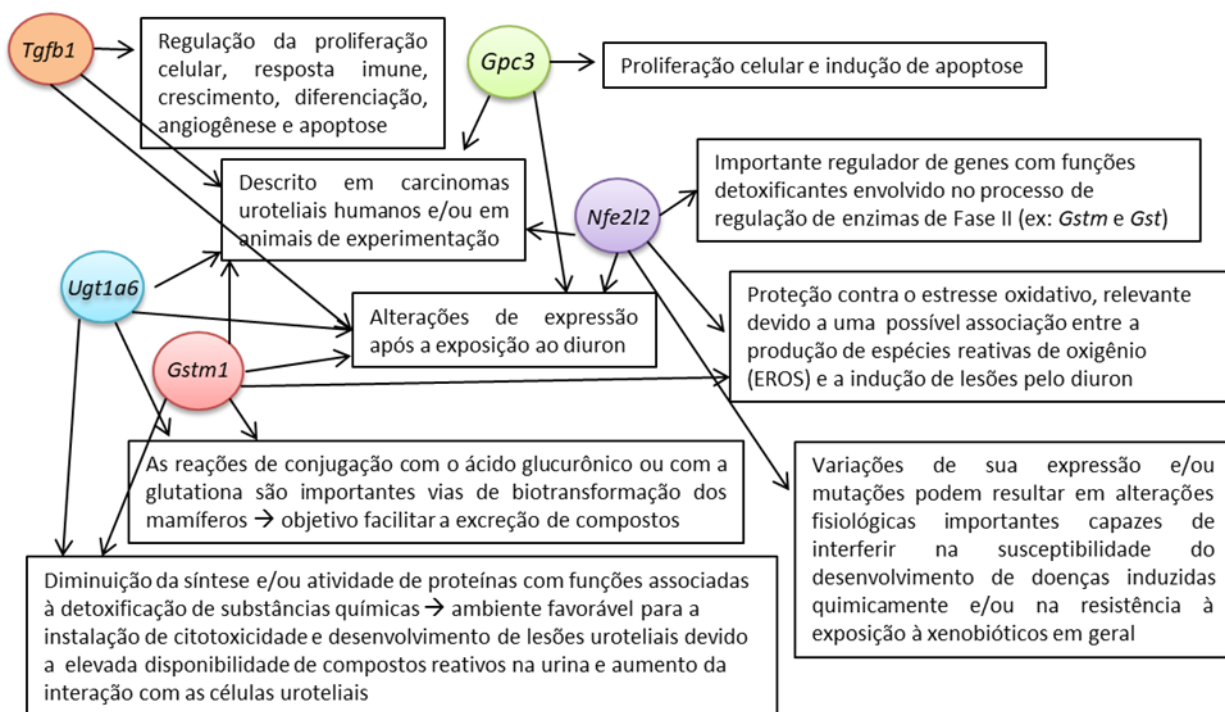


Figura 2: Resumo gráfico das principais funções dos genes escolhidos para análise. O resumo gráfico é uma forma concisa de resumir e exemplificar conteúdos, seu uso tem sido incentivado por revistas importantes área de toxicologia (*Toxicology* : fator de impacto (FI) 3,58; *Food and Chemical Toxicology* FI: 3,77). Número de acesso dos genes (ID): *Tgfb1* (59086), *Gpc3* (25236), *Ugt1a6* (113992), *Gstm1* (24423), *Nfe2l2* (83619)

1.5 DOSE-RESPOSTA DO DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

A relação de dose-resposta após a exposição ao diuron ocorre tanto na indução de alteração de expressão gênica (Ihlaseh et al., 2011; Ihlaseh-Catalano et al., 2014) como nas incidências de alterações morfológicas (Ihlaseh et al., 2011; Cardoso et al., 2013). A avaliação da exposição às concentrações de 60, 125, 500, 1250 e 2.500ppm de diuron por 20 semanas mostrou à microscopia eletrônica de varredura (MEV), que a incidência e severidade das lesões uroteliais induzidas pelas concentrações de 1250ppm e 2500ppm eram as mesmas. Mais intrigante do que isso, a concentração intermediária de 500ppm foi capaz de induzir alterações uroteliais potencialmente neoplásicas e.g. necrose, esfoliação e hiperplasia em 50% dos

animais expostos (Cardoso et al., 2013) sugerindo que o potencial citotóxico e cancerígeno dessa concentração não pode ser descartado. Ainda, considerando essas alterações como efeito adverso para este nível de exposição, pode-se considerar a concentração de 500ppm como a de menor nível de efeito adverso observado, a LOAEL (Cardoso et al., 2013). Corroborando esses achados, o cálculo da dose de referência (*benchmark dose*) do diuron para efeitos apicais mostrou que a concentração necessária para o desenvolvimento de hiperplasia urotelial na bexiga de ratos Wistar após 20 semanas de exposição é de 22mg/kg/dia, valor proporcional à 500ppm (Bhat, 2014). Estas observações mostram que, mesmo em concentrações inferiores à 2500ppm, o diuron mantém seu potencial de citotoxicidade urotelial e proliferação celular regenerativa.

Nos estudos de carcinogenicidade química, a utilização concomitante de diferentes métodos de análises (ex: morfologia, imunohistoquímica e biologia molecular) que possibilitem aos pesquisadores relacionarem alterações moleculares com as modificações morfológicas são de extrema importância para a elucidação dos mecanismos de ação das substâncias teste.

1.6 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de lesões uroteliais à MEV em ratos expostos ao diuron 500ppm em ensaios de média duração de 20 semanas (Cardoso et al., 2013) e o comprometimento de vias moleculares associadas ao câncer de bexiga em ensaios de curta duração de 07 dias (Ihlaseh et al., 2014), levantou o

Revisão de Literatura

questionamento sobre o potencial citotóxico e potencialmente cancerígeno desta concentração ao urotélio de ratos. Apesar do papel de elevadas concentrações (1.250 e 2.500 ppm) do diuron na instalação de citotoxicidade e desencadeamento de processo hiperplásico relacionado à carcinogênese urotelial estar bem estabelecido, não há na literatura estudo crônico e subcrônico que avalie o potencial de carcinogenicidade e a indução de alterações transcricionais relevantes ao desenvolvimento da carcinogênese urotelial para a concentração de 500ppm. Isto é relevante, pois esta concentração é cinco (5) vezes menor do que a referida na literatura como cancerígena. Portanto, evidências de carcinogenicidade para essa dose causariam impacto direto na definição de doses de referência (LOAEL), e consequentemente, na avaliação e administração do risco deste herbicida, pois o LOAEL estaria muito próximo do NOAEL atualmente aceito, que é de 125ppm.

1.7 OBJETIVOS DO ESTUDO

- ✓ Avaliar a expressão dos genes *Tgfb1*, *Gpc3*, *Nfe2l2*, *Ugt1a6* e *Gstm1* após 20 ou 84 semanas de exposição ao diuron 500ppm.
- ✓ Verificar se a exposição crônica ao diuron 500ppm por 84 semanas seria capaz de induzir lesões neoplásicas.
- ✓ Comparar a relação entre a alteração da expressão gênica e o desenvolvimento de lesões uroteliais nos diferentes momentos experimentais.

2.0 REFERÊNCIAS:

- Al-Azayzih, A., Gao, F., Goc, A., Somanath, P. R. 2012. TGF β 1 induces apoptosis in invasive prostate cancer and bladder cancer cells via Akt-independent, p38 MAPK and JNK/SAPK-mediated activation of caspases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. 427, 165-170.
- Amatangelo, M. D., Goodyear, S. M., Varma, D., Stearns, M. E. 2012. C-myc expression and MEK1 induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer. *Carcinogenesis.* 33, 1965-1975.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M. R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology.* 26, 196.
- APVMA, 2005 Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority. The reconsideration of approvals of the active constituent diuron, registrations of products containing diuron and their associated labels. *Tech. Assess. Rep.* 2, 40.
- APVMA, 2011 Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority. Review of the Mammalian Toxicology and Metabolism/Toxicokinetics of Diuron. *Diuron Human Health Assessment.* Australian Government.
- Bauer, A.K., Hill, T., Alexander, C.M., 2013. The involvement of NRF2 in lung cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 171, 3196 – 211.
- Bhat, V. S., 2014. Benchmark Dose-Response Modeling Approaches to Integrate Toxicogenomics Into Quantitative Risk Assessment. *Riverside Electronic Theses and Dissertations:* <https://escholarship.org/uc/item/3w1833xx>.
- Bock, K. W. & Kohle, C. 2005. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol.* 400, 57-75.
- Boven, M.V., Laruelle, L., Daenens, P., 1990. HPLC analysis of diuron and metabolites in blood and urine. *J. Anal. Toxicol.* 14, 231–234
- Burger, M., Catto, J.W., Dalbagni, G., Grossman, H.B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L.A., La Vecchia, C., Shariat, S., Lotan, Y. 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 63, 234-41.
- Cano-Gauci, D.F., Song, H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., et al., 1999. Glypican-3-deficient mice exhibit the overgrowth and renal abnormalities typical of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J. Cell. Biol.* 146, 225-264.
- Cardoso, A.P., Ihlaseh Catalano, S.M., da Rocha, M.S., Nascimento e Pontes, M.G, de Camargo, J.L, de Oliveira, M.L., 2013. Dose-response of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in the urothelial mucosa of Wistar rats. *Toxicology.* 312,1-5.
- Tascón, R., Lago Huvelle, M.R., Novack, G., Llorens, M.C., Dos Santos, A.F., Shortrede, J., Cabanillas, A.M., Bal de Kier Joffé, E., Labriola, L., Peters, M.G. 2016. Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in human breast cancer cells. *Oncotarget.* 37, 60133-60154.
- Chirilă, D. N., Bălăcescu, O., Popp, R., Oprea, A., Constantea, N. A., Vesa, S., Ciuce, C., 2014. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in patients with multiple breast cancers and breast cancer in association with another type of cancer. *Chirurgia (Bucur).* 109, 626-33.
- Coecke, S., Ahr, H., Blaauboer, B. J., Bremer, S., Casati, S., Castell, J., Combes, R., Corvi, R., Crespi, C. L., Cunningham, M. L., et al., 2006. Metabolism: A bottleneck in in vitro toxicological test development. *Altern. Lab. Anim.* 34, 49–84.
- Cohen, S. M., 2004. Human carcinogenic risk evaluation: An alternative approach to the two-year rodent bioassay
- Cohen, S.M., Ohnishi, T., Clark, N.M., He, J., Arnold, L.L., 2007. Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. *Toxicol Pathol* 35, 337-47.
- Crawford, J. M., 2008. The origins of bladder cancer. *Laboratory investigation.* 88, 686-693.

- Dietrich, H. & Dietrich, B. 2001. Ludwig Rehn (1849–1930): Pioneering findings on the aetiology of bladder tumors. *World J Urol.* 19, 151–153.
- Faustman, E.L., Omenn, G.S., 2008. In: Klaassen, C.D. (Ed.), *Risk Assessment*, in Casarett & Doull's *Toxicology*, seventh ed., p. 112.
- Fava, R.M., Cardoso, F. P. A., da Rocha, S. M., Nascimento e Pontes, M. G., de Camargo, J. L. V., de Oliveira, M. L. C. S., 2015. Evaluation of early changes induced by diuron in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. *Toxicology*.333, 100-106.
- Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wington, P.J., 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.* 32, 171–179.
- Fico, A., Maina, F., Dono, R., 2011. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. *Cell Mol. Life. Sci.* 68, 923–929.
- Filmus, J., Capurro, M., Rast, J., 2008. Glypicans. *Genome Biol.* 9:224.
- Filmus, J. & Capurro, M., 2013. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. 280, 2471-2476.
- Foda, A.A., Mohammad, M.A., Abdel-Aziz, A., El-Hawary, A.K. 2015. Relation of glypican-3 and E-cadherin expressions to clinicopathological features and prognosis of mucinous and non-mucinous colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol.*36, 4671-9.
- García-Closas, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D.W., Tardón, A., Serra, C., Carrato, A., García-Closas, R., Lloreta, J., Castaño-Vinyals, G., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Chatterjee, N., Wacholder, S., Samanic, C., Torà, M., Fernández, F., Real, F.X., Rothman N., 2013. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet.* 366, 649-59.
- Gailey, M.P., Bellizzi, A.M. 2013. Immunohistochemistry for the novel markers glypican 3, PAX8, and p40 (Δ Np63) in squamous cell and urothelial carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 140, 872-80.
- Geng, J., Fan, J., Ouyang, Q., Zhang, X., Zhang, X., Yu, J., Xu, Z., Li, Q., Yao, X., Liu, X., Zheng, J. 2014. Loss of PP M1A expression enhances invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer by activating the TGF- β /Smad signaling pathway. *Oncotarget.* 5, 5700-5711.
- Giuliani, L., Gazzaniga, P., Caporuscio, F., Ciotti, M., Frati, L., and Agliano, A.M. 2001. Can down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases in the urinary bladder tissue impact the risk of chemical carcinogenesis? *Int. J. Cancer.* 91, 141-143.
- Giuliani, L., Ciotti, M., Stoppacciaro, A., Pasquini, A., Silvestri, I., De Matteis, A., Frati, L., Agliano, A. M. 2005. UDP-glucuronosyltransferases 1A expression in human urinary bladder and colon cancer by immunohistochemistry. *Oncol Rep.* 13, 185,191.
- Gonzalez, A. D., Kaya, M., Shi, W., Song, H., Testa, J.R., Penn, L.Z., Filmus, J., 1998. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol.* 141, 1407-1414.
- Gomide, L. M. M., Ihlaseh – Catalano, S. M., Rosa, F. E., Wolf, D. C., not published. The Glypican 3 (Gpc3) gene is involved in the early urothelial carcinogenesis induced in the rat by the herbicide diuron.
- DeGraff, D.J., Cate, J.M., Mauney, J.R., Adam, R.M., 2011. When urothelial differentiation pathways go wrong: Implications for bladder cancer development and progression. *Urol Oncol* 6, 802-11.
- DeGraff, D.J., Robinson, V.L., Shah, J.B., Brandt, W.D, Sonpavde, G., Kang, Y., Liebert, M, Wu, X.R., Taylor, J.A., 2012. Current preclinical models for the advancement of translational bladder research. *Mol Cancer.* 12, 121-30.
- Gu, J., Zou, H., Zheng, L., Li, X., Chen, S., Zhang L., 2014. GSTM1 null genotype is

associated with increased risk of gastric cancer in both ever-smokers and non-smokers: a meta-analysis of case-control studies. *Tumour Biol.* 35, 3439-3445.

Hartung, T. and Daston, G., 2009. Are in vitro tests suitable for regulatory use? *Toxicol. Sci.* 111, 233-7.

Hayden, A., Douglas, J., Sommerlad, M., Andrews, L., Gould, K., Hussain, S., Thomas, G.J., Packham, G., Crabb, S.J., 2014. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urol. Oncol.* 32, 806-814.

Hayes, J. D. & Pulford, D. J. 1995. The glutathione S- transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30, 445-600.

Ihlaseh, S.M., Bailey, K.A., Hester, S.D., Jones, C., Ren, H., Cardoso A.P., Oliveira, M.L., Wolf, D., de Camargo, J.L. 2011. Transcriptional profile of diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. *Tox.Sci.* 122, 330-338.

Ihlaseh-Catalano, S. M, Bailey, K., Cardoso, A. P. F., Ren, H., Fry, R. C., de Camargo, J. L. V., Wolf, D. C. 2014. Dose and temporal effects on gene expression profiles of urothelial cells from rats exposed to diuron. *Toxicology.* 325, 21-30.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva., 2018. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA.

Iida, K., Itoh, K., Maher, J. M., Kumagai, Y., Oyasu, R., Mori, Y., Shimazui, T., Akaza, H., Yamamoto, 2007. M. Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 11, 2398-2403.

Iida, K., Mimura, J., Itoh, K., Ohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., Shimazui, T., Akaza, H., Yamamoto, M. 2010. Suppression of AhR signaling pathway is associated with the down-regulation of UDP- glucuronosyltransferases during BBN-induced urinary bladder carcinogenesis in mice. *J Biochem.* 147, 353-360.

Iyer, P., 2002. Evidence on the development and reproductive toxicity of diuron. Draft. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section. Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, 43.

Kajdaniuk, D., Marek, B., ., Borgiel-Marek, H., Kos-Kuda, B. 2013. Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol.* 64,384-96.

Kang, H.W., Song, P. H., Ha, Y. S., Kim, Y. J., Yun, S. J., Lee, S. C., Choi, Y. H., Moon, S. K., Kim, W. J., 2013. Glutathione S- transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility and outcomes in muscle invasive bladder cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 49, 3010-3019.

Klaassen, C. D., Watkins III, J. B. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull. 2ed ed. Mc Graw Hill, 2012.

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., and Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 38, 96–109.

Kawasaki, Y., Ishigami, S., Arigami, T., Uenosono, Y., Yanagita, S., Uchikado, Y., Kita, Y., Nishizono, Y., Okumura, H., Nakajo, A., Kijima, Y., Maemura, K., Natsugoe, S., 2015. Clinicopathological significance of nuclear factor (erythroid-2)-related factor 2 (Nrf2) expression in gastric cancer. *BMC Cancer.* 15, 15-5.

Leist, M., Hasiwa, N., Rovida, C., Daneshian, M., Basketter, D., Kimber, I., Clewell, H., Gocht, T., Goldberg, A., Busquet, F., Rossi, A. M., Schwarz, M., Stephens, M., Taalman, R., Knudsen, T. B., Mckim, J., Harris, G., Pamies, D., Hartung, T., 2014. Consensus report on the future of animal-free toxicity testing. *ALTEX.* 31, 341-56

Lukas, C., Selinski, S., Prager, H.M., Blaszkewicz, M., Hengstler, J.G., Golka, K., 2017. Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis. *J Toxicol Environ Health,* 80, 439-452.

Man, X.B., Tang, L., Zhang, B.H., et al., 2005. Upregulation of glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int.* 25,962- 966.

- Matic, M., Pekmezovic, T., Djukic, T., Mimic-Oka, J., Dragicevic, D., Krivic, B., Suvakov, S., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Tulic, C., Coric, V., Simic, T., 2013. GSTA1, GSTM1, GSTP1, and GSTT1 polymorphisms and susceptibility to smoking-related bladder cancer: a case-control study. *Urol Oncol.*;31, 1184-92
- McMullen, P. D., Andersen, M. E., Cholewa, B., Clewell III, J. H., Dunnick, K. M., Hartman, J. K., Mansouri, K., Minto, M. S., Nicolas, C. I., Phillips, M. B., Slattery, S., Yoon, M., Clewell, R. A., 2018. Evaluating opportunities for advancing the use of alternative methods in risk assessment through the development of fit-for-purpose in vitro assays. *Toxicology in Vitro.* 48, 310-317.
- Meek, M.E., Boobis, A., Cote, I., Dellarco, V., Fotakis, G., Munn, S., Seed, J., Vickers, C., 2013. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J Appl. Toxicol.* 34, 1-18.
- Meng, X., Liu, Y., Liu, B., 2014. Glutathione S-transferase M1 null genotype meta-analysis on gastric cancer risk. *Diagn. Pathol.* 9, 119-122.
- Moon, E.J., Giaccia, A., 2014. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 292-9.
- Murthy, S. S., Shen, T., De Rienzo, A., et al., 2000. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene.* 19, 410-416.
- Narayan, S., Thangasamy, T., Balusu, R., 2005. Transforming growth factor-beta receptor signaling in cancer. *Front Biosci.* 10, 1135- 1145.
- Nascimento, M.G., de Oliveira, M.L., Lima, A.S., de Camargo, J.L., 2006. Effects of Diuron [3-(3, 4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology.* 224, 66-73.
- OECD (2009), Test No. 451: Carcinogenicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071186-en>.
- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., Nishida, T., 2003. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar Pollut Bull.* 47, 59-67.
- Olfat Shaker, M.D., Olfat Hammam, M.D., Mohamed Wishahi, M.D., Mamdouh Roshdi, M.D. 2013. TGF-B1 pathway as biological marker of bladder carcinoma schistosomal and non-schistosomal. *Urologic Oncology.* 31, 372- 378.
- Oliveira, P. A., Colaço, L. F., De la Cruz, P., Lopes, C., 2006. Experimental bladder carcinogenesis rodent models. *Experimental Oncology.* 28, 2-11.
- Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., 2014. The UDP- glucuronosyltransferase of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci.* Doi: 10.3389/fncel.2014.00349
- Pan, C., Zhu, G., Yan, Z., Zhou, Y., Liu, Z., 2014. Glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms are associated with lung cancer risk in a gender-specific manner. *Oncol. Res. Treat.* 37, 164-169.
- Reszka, E., Jablonowski, Z., Wieczorek, E., Jablonska, E., Krol, M. B., Gromadzinska, J., Grzegorzczak, A., Sosnowski, M., Wasowicz, W., 2014. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 140, 1723–1731.
- da Rocha, M.S., Nascimento, M.G., Cardoso, A.P., de Lima, P.L., Zelandi, E.A., de Camargo, J.L., de Oliveira, M.L., 2010. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicol Sci.* 113, 37–44.
- da Rocha, M.S., Arnold, L.L., Pennington, K.L., Muirhead, D., Dodmane, P.R., Anwar, M.M., Battalora, M., de Camargo, J.L., Cohen, S.M., 2012. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Toxicol. Sci.* 130, 281–288.
- da Rocha, M.S., Arnold, L.L., Dodmane, P.R., Pennington, K.L., Qiu, F., de Camargo, J.L., Cohen, S.M., 2013. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology.* 314, 238-246.
- da Rocha, M.S., Arnold, L.L., de Oliveira, M.L., Catalano, S.M., Cardoso, A.P., Pontes, M.G., Ferruccio, B., Dodmane, P.R., Cohen, S.M., de Camargo, J.L., 2014. Diuron-induced rat

urinary bladder 35carcinogenesis: mode of action and human relevance evaluations using the international Programme on Chemical Safety framework. *Crit. ver. Toxicol.* 44, 393- 406.

Roque M. R. A., Melo, I.S., 2000. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. *Scientia Agricola* 57, 723-72.

Rowland, A., Minners, J.O., Mackenzie, P.I. 2013. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* 45, 1121-1132.

Saber, M.A., MM AbdelHafiz, S., Khorshed F.E., Aboushousha, T.S., Hamdy, H.E., Seleem, M.I., Soliman, A.H. 2017. Differential Expression of Glypican-3 and Insulin-Like Growth Factor-II mRNAs and Alpha-Fetoprotein and Ki-67 Markers in HCV Related Hepatocellular Carcinomas In Egyptian Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 18, 121-127.

Safarinejad, M.R., Safarinejad, S., Shafiei, N., Safarinejad, S. 2013. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase(GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. *Urol Oncol.* 31,1193-1203.

Saikali Z. & Sinnett, D., 2000. Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *Int. J. Cancer.* 89, 418-422.

Sanches-Carbayo, M., Socci, N. D., Lozano, J. J., Li, W., Charytonowicz, E., Belbin, T. J., Prystowsky, M. B., Ortiz, A. R., Childs, G., and Cordon- Cardo, C., 2003. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am. J. Pathol* 163, 505–516.

Sen, Sparrow, S.S., Robinson, S., Bolam, S., Bruce, C., Danks, A., Everett, D., Fulcher, S., Hill, R. E., Palmer, H., Scott, E. W., Chapman, K. L., 2011. Opportunities to minimize animal use in pharmaceutical regulatory general toxicology: a cross-company review. *Regul Toxicol Pharmacol.* 61, 222-229

Strassburg, C. P., Manns, M. P., Tukey, R. H. 1997. Differential down-regulation of the UDP- glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res.* 57, 2979-2985.

Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P., Tukey, R. H. 1998. Polymorphic expression of the UDP- glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol.* 54, 647-654.

Sundararaghavan, V.L., Sindhwani, P.2., Hinds, T.D. 2017. Glucuronidation and UGT isozymes in bladder: new targets for the treatment of uroepithelial carcinomas? *Oncotarget.* 10, 3640-3648.

Tzong-Tyng, H., Wangc, H., Kingsley, E. A., Risbridger, G. P., Pamela J. Russell, P. J. 2008. Molecular profiling of bladder cancer: Involvement of the TGF-b pathway in bladder cancer progression. *Cancer Letters.* 265, 27-38.

U.S. Environmental Protection Agency., 1997. Carcinogenicity peer review of diuron: Office of Prevention, Pesticides and Toxic substances. [Memorandum]. Cincinnati, 22p

U.S. Environmental Protection Agency., 2003. Registration Eligibility Decision for Diuron. List A. Case 0046. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. USEPA, Washington, DC.

Valentovic, M.A., Yahia, T., Ball, J.G., Hong, S.K., Brown, P.I., Rankin, G.O., 1997. 3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats. *Toxicology* 124, 125–134.

Wang, Y., Du, C., Zhang, N., Li, M., Liu, Y., Zhao, M., Wang, F., Luo, F. 2018. TGF- β 1 mediates the effects of aspirin on colonic tumor cell proliferation and apoptosis. *Oncol Lett.* 15, 5903-5909.

Xylinas, E., Cha, E. K., Khani, F., Kluth, L. A., Rieken, M., Volkmer, B. G., Hautmann, R., Küfer, R., Chen, Y. T., Zerbib, M., Rubin, M. A., Scherr, D.S., Shariat, S. F., Robinson, B.D., 2014. Association of oncofetal protein expression with clinical outcomes in patients with urothelial carcinoma of the bladder. 191, 830- 841.

Zhang, N., Bi, X., Zeng, Y., Zhu, Y., Zhang, Z., Liu, Y., Wang, J., Li, X., Bi, J., Kong, C., 2016. TGF- β 1 promotes the migration and invasion of bladder carcinoma cells by increasing fascin1 expression. *Oncol Rep.* 36, 977-83.

Parte II

MANUSCRITO:

O manuscrito apresentado a seguir será submetido para publicação na revista *Toxicology* (ISSN 0300-483X, Fator de Impacto 2016 = 3.582). Auxílios financeiros: FAPESP (Auxílio Regular processo N°: 2015/11628-6 e bolsa de treinamento técnico processo N°: 2016/22955-0), CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico) - Bolsa de doutorado processo: N°: 14306/2014-5 e Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM).

**UROTHELIAL CHANGES INDUCED BY 500PPM DIURON
CONCENTRATION IN A LONG TERM EXPOSURE**

Rafaela Marono Fava¹ ramarono@gmail.com

Bianca Camargo Penteado Sales¹ bianca.cp.sales@hotmail.com

Osvaldo Luís Benedito¹ olbenedito@gmail.com

Nathalia Pereira Souza¹ nathalips@gmail.com

Isabela Poscidonio Santos¹ isaposcidonio@hotmail.com

Carolina Vaccari¹ carol.vaccari@gmail.com

Shadia Muhammad Ihlaseh Catalano² shadia.catalano@basf.com

João Lauro Viana de Camargo¹ decam@fmb.unesp.br

Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira¹ mdeolive@fmb.unesp.br

¹Center for the Evaluation of the Environmental Impact on Human Health
(TOXICAM), Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo
State University, Botucatu, São Paulo, Brazil. 18618-970

² Present address: BASF, São Paulo, Brazil

Address correspondence to:

Dr. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira

Department of Pathology, Botucatu Medical School,

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n

Unesp – São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, SP, Brazil. 18618-687

E-mail: mdeolive@fmb.unesp.br

Phone number: +55 14 38801575; Fax: +55 14 38152348

1.0 ABSTRACT

Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), a substituted urea herbicide, induced urothelial tumors in the urinary bladder of Wistar rats fed dietary concentration of 2500ppm in a two-year bioassay. Successive studies from our laboratory suggested that the concentration of 500ppm could be cytotoxic and potentially carcinogenic to the rat urothelium. This study evaluated urothelial changes induced by 500ppm diuron in a medium and long-term study (20 and 84 weeks respectively) in rats. One hundred and thirty-two male Wistar rats were allocated to control or to 500ppm diuron-fed groups and evaluated after 20 or 84 weeks. Urinary bladder and kidney histology and scanning electron microscopy of the urinary bladder were performed. The expression of *Gpc3*, *Ugt1a6*, *Nfe2l2*, *Tgfb1* and *Gstm1* genes was evaluated by real time quantitative RT-PCR. After 84 weeks of exposure, the incidence of simple hyperplasia was significantly increased in the urinary bladder (10/18) and kidney pelvis (23/25) in the diuron group when compared to control (2/22 and 9/30) respectively. In both experimental periods, the *Gpc3* gene expression, involved in cellular proliferation, was decreased and the *Ugt1a6* gene expression, related to xenobiotic metabolism, was increased in the diuron group. The expression of *Nfe2l2* gene, related to oxidative stress, was increased only in the 20-week exposure. In this study, although the concentration of 500ppm behaved morphologically as no observable adverse effect level (NOAEL) in the 20-week exposure, the gene expression alterations showed urothelial perturbations related to cell proliferation, oxidative stress and xenobiotic metabolism. The long-term 500ppm diuron dietary exposure is cytotoxic, able to induce urothelial hyperplasia and gene expression changes, and therefore, it may be considered as the lowest observable adverse effect level (LOAEL) of exposure in rats.

Keywords: Diuron, urinary bladder, urothelium, hyperplasia, cytotoxicity, gene expression.

2.0 ABBREVIATIONS

BMD, Benchmark dose

CPD, Critical point dried

Gpc3, Glypican 3

Gstm1, Glutathione S-transferase mu 1

LD₅₀, Lethal Dose, 50%

LM, Light microscopy

LOAEL, Lowest observable adverse effect level

NOAEL, No observed adverse effect level

Nfe2l2, Nuclear factor, erythroid 2-like 2

MOA, Mode of action

qRT-PCR, Real time PCR

SEM, Scanning electron microscopy

SH, Simple hyperplasia

Tgtb1, Transforming growth factor beta 1 gene

Ugt1a6, UDP glucuronosyltransferase family 1 member A6

3.0 INTRODUCTION

Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) is a substituted urea herbicide used to control weeds in many agricultural crops (e.g., fruit, cotton, alfalfa, sugar cane, wheat, and soy) (Iyer, 2002; USEPA, 2003) and in uncultivated surfaces including roadsides, railways and parks (Oturán et al., 2008).

Diuron has low acute toxicity when administered by the oral, dermal or inhalation routes, the oral LD₅₀ for rats is approximately 4000 mg/Kg body weight (b.w.), value proportional to 100.000ppm (USEPA, 2003; EFSA, 2005). This herbicide was classified by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as a “known/likely” human carcinogen based on a 2-year bioassay (0, 25, 250 and 2500ppm) that demonstrated increased incidences of urinary bladder carcinomas in male Wistar rats after dietary exposure to 2500ppm (111mg/kg/day) (USEPA, 1997; Iyer, 2002). In that long-term study, the no observed adverse effect level (NOAEL) for carcinogenicity was set at 250ppm (10mg/kg/day).

Diuron is a non-genotoxic compound (Iyer, 2002; USEPA, 2003, Nascimento et al., 2006; da Rocha et al., 2010). The mode of action (MOA) postulated to diuron induced urothelial carcinogenesis after exposure to high concentrations involves cytotoxicity by toxic metabolites (mainly DCPU and 2-OH-DCPU) as evidenced by swollen cells, necrosis and exfoliation, followed by regenerative cell proliferation, hyperplasia, and eventually urinary bladder

tumors (da Rocha et al., 2013, 2014).

The establishment of threshold doses in toxicological studies has been recognized as one of the essential components of risk assessment and it is essential to the consistency of the substance regulation (Bevan and Harrison, 2017). In the diuron carcinogenicity study, few dietary dose levels were evaluated (25, 250, 2500ppm), showing adverse effects in the epithelium of the urinary bladder only at the highest dose of 2500ppm (Iyer, 2002). Due to the large gap among the concentrations used in that study, our group performed a 20-week medium term study which demonstrated that the transcriptional changes (Ihlaseh et al., 2011) and increase of incidence and severity of urothelial simple hyperplasia (SH) induced by 1.250ppm were similar to 2.500ppm (Cardoso et al., 2013). The biological functions associated with the gene expression changes induced by these concentrations were related with effects on amino acid metabolism, lipids and greater response to oxidative stress (glutathione and xenobiotic metabolisms), alterations possibly associated with diuron cytotoxicity and sustentation of urothelial hyperplasia (Ihlaseh et al., 2011). Furthermore, decreasing of gene expressions related to xenobiotic metabolism such as nuclear factor, erythroid 2-like 2 (*Nfe2l2*), UDP glucuronosyltransferase family 1 member A6 (*Ugt1a6*) and glutathione S-transferase mu 1 (*Gstm1*) has also been linked to a greater susceptibility to the development of urinary bladder cancer in humans (Sundararaghavan et al., 2017).

The scanning electron microscopy (SEM) evaluation in 20-week period showed that the concentration of 500ppm also induced severe urothelial changes, characterized by areas of necrosis, exfoliation and urothelial cell hyperplasia in 5/10 rats (50%) (Cardoso et al., 2013). The NOAEL for this study was 125ppm of the diet (Cardoso et al., 2013). Bhat, 2014 using the calculation of benchmark dose (BMD) for apical events showed that after 20 weeks of diuron exposure the concentration necessary to the development of urothelial SH in the urinary bladder of Wistar rats was 22mg/kg/day, proportional to 500ppm. These results suggest that even at concentrations lower than 2500ppm, diuron maintains the potential for urothelial cytotoxicity and regenerative proliferation.

Interestingly, in a short-term experimental seven days study, changes in urothelial gene expression induced by 500ppm were similar to those described in 2500ppm (Ihlaseh-Catalano et al., 2014). Of note, the transforming growth factor beta 1 gene (*Tgfb1*), involved in several biological processes such as regulation of cell proliferation, immune response, growth, differentiation, angiogenesis and apoptosis (Narayan et al., 2005; Kajdaniuk et al., 2013), was considered the most relevant regulator of the transcriptional response of these groups (Ihlaseh-Catalano et al., 2014).

Another important gene, the glypican 3 (*Gpc3*), involved in the process of cell proliferation and, possibly, the induction of apoptosis (Gonzalez et al., 1998; Cano-Gauci et al., 1999) showed decreased expression after seven

(07) days and 20 weeks of exposure to different diuron concentrations (Gomide et al., in submission).

The report of transcriptional and morphological changes induced by 500ppm of diuron raised concerns about the role of this lower concentration for carcinogenic activity. Furthermore, evidence of cytotoxicity and potential of carcinogenicity for 500ppm diuron could impact in the risk assessment, since it is fivefold lower overall than the carcinogenic concentration of 2500ppm and, very close to the currently accepted NOAEL of 250ppm (Iyer, 2002).

Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the development of lesions in the urinary bladder of male Wistar rats exposed for 20 or 84 weeks at 500ppm diuron, and to compare the transcriptional expressions of the *Tgfb1*, *Gpc3*, *Nfe2l2*, *Ugt1a6* and *Gstm1* genes between exposed and non-exposed animals at each evaluation moment.

4.0 MATERIAL AND METHODS

4.1 Animal exposure and sample collection

This study was approved by the Committee for Animal Experimentation of the UNESP, Medical School, SP, Brazil, Protocol No. 1090/2014. One hundred and thirty-two four weeks old male Wistar rats were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil). Animals were housed in polypropylene cages (four animals/cage) with metallic grill covers, corncob bedding and maintained in a

room at $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 20\%$ humidity and a 12h light/dark cycle, with the light changing at 0700 and 1900h.

Diuron (CAS No. 30-54-1, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was mixed with powdered commercial diet (Nuvilab, Nuvital, PR) at a final concentration of 500ppm. Following two weeks of acclimation period, the animals were weighed and randomized into four groups that were allocated to either 20 or 84-week exposure - when the experiment was interrupted in order to maintain a reasonable number of surviving animals for each analysis. Groups with 16 animals each were assigned to the 20-week experiment: group 1 (G1) Control basal diet, and group 2 (G2) 500ppm diuron. Groups with 50 animals each were assigned to the 84-week experiment: group 3 (G3) Control basal diet and group 4 (G4) 500ppm diuron (Figure 1). Tap water and food were provided *ad libitum*.

Water and food consumptions and body weights were determined at the commencement and every other week during the experiment. At the end of each experimental period, the rats were euthanized under anesthesia (ketamine 80 ml, 90 mg/Kg and xylazine 2%, 10 to 13 mg/kg intraperitoneally, i.p.), then opening the abdominal cavity and severing the inferior vena cava. All the rats were euthanized between 8:00 and 11:00 AM, one from each group, alternated and non-fasted overnight. The urinary bladders were processed for morphological analyses by light microscopy (LM) and scanning electron macroscopy (SEM) or for gene expression analyses by real time PCR

(qRT-PCR). The number of rats used in each analysis is described in the respective procedures listed below.

For morphological analyses, the urinary bladder was exposed, injected through the urethra with Bouin's fixative *in situ*, removed and immersed in the same fixative. After 4 hours of fixation, the urinary bladder was cut mid-sagittally and rinsed in 70% alcohol. One-half was processed for LM and the other half for SEM evaluation by standard procedures (Fava et al., 2015).

For RNA isolation, the urinary bladder was exposed, injected transurethrally with 1 ml of cold RNase-free PBS (Applied Biosystems, Foster City, CA), everted on a glass rod to expose the urothelium, gently shaved and the urothelium transferred to 1 ml of TRIzol solution (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). The whole urinary bladder was also immersed in the TRIzol, briefly vortexing and kept for 10 minutes at room temperature. Then, the urinary bladders were removed from the tube; the TRIzol solution was placed in liquid nitrogen, and finally, stored at -80 °C. The remaining urinary bladder tissue was fixed in Bouin's fixative and evaluated for the extent of removal of the urothelium. The removal efficiency was graded according to the percentage (%) of epithelial cells remaining per bladder strip: <5% – grade 0; 5–10% – grade 1; 11–50 % – grade 2 and >50% – grade 3. Only samples with grades 0 and 1 and with intact basal membrane were used in subsequent RNA isolation steps, as previously described (Ihlaseh et al. 2011).

Kidneys, liver and spleen were also removed, weighed and immersed in 10% buffered formalin, and processed for routine histopathologic evaluation.

4.2 Morphological analyses

4.2.1 Light Microscopy (LM) analyses of urinary bladder and kidney pelvis

Following fixation, one half of the urinary bladder from each animal was cut longitudinally into four strips, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examination. The urinary bladder sections were analyzed by two observers using a conventional optical microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) for the occurrence of proliferative lesions, particularly SH. The simple hyperplasia in the bladder or kidney pelvis epithelium was classified as mild when there were 4–5 cell layers, as moderate 6–8 cell layers and severe when more than 8 cell layers (Cohen et al., 2007). For LM documentation, the slides were digitalized using Pannoramic MIDI (3DHISTECH Ltd.) hardware; the images were captured by Pannoramic Viewer software (1.15.4 version) and saved in BMP format. The number of animals evaluated by urinary bladder histology was: G1: n= 12, G2: n= 08, G3: n= 22 and G4: n= 18.

The kidney pelvis histology was performed on all rats including the animals submitted to the gene expression evaluation: G1 and G2: n= 16 each group, G3: n= 30 and G4: n= 25.

4.2.2 Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses of urinary bladder

For detection of superficial urothelial changes, SEM analyses was

performed in animals of both experimental periods G1: n= 10, G2: n= 08, G3: n=06 and G4: n= 06. For this propose, the half of the urinary bladder for SEM examination was critical point dried (CPD) (Balzers CPD-020, Bal-Tec, Wiesbaden, Germany), mounted on aluminum SEM stubs and placed in a sputter coater (Bal-Tec SCD 050) to be coated with a thin layer of gold. The SEM analysis from the 20-week study was performed using a scanning electron microscope (Carl Zeiss Model EVO LS15, Germany) at the Department of Physics of UNESP's Bauru School of Sciences, São Paulo, Brazil. The SEM from the 84-week study was performed in a Quanta 200 Scanning Electron Microscope (Fei Company, Hillsboro, Oregon, USA) in the Electron Microscopy Center at the Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

The urothelial alterations by SEM were classified in five categories: normal urothelium and slightly altered mucosa are included in Classes 1–3, and progressively more altered mucosa in Classes 4 and 5 (Cohen et al., 2007). The SEM and LM analyses were performed by two evaluators in agreement, being the second evaluation performed blindly in relation to the knowledge of the treatment group.

4.3 RNA extraction, cDNA preparation and real time PCR

The total RNA from the urothelial cells immersed in TRIzol was extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA- cat. No. 74104). Purified total RNA was eluted in dH₂O and its concentration was measured using an Epoch spectrometer (Epoch, BioTek Instruments, Inc., VT, USA). The

cDNA was obtained from the samples using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) following the kit instructions, and was submitted to qRT-PCR in a StepOne-Plus™ Real-time PCR System (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA).

A *singleplex* reaction was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) for the quantification of *Tgfb1* (Rn00572010_m1), *Ugt1a6* (Rn00756113_mH), *Gstm1* (Rn00755117_m1), *Nfe2l2* (Rn00582415_m1) and *Gpc3* (Rn00516722_m1) gene expressions. The *Actb* (Rn00667869_m1) gene was used as endogenous control to normalize gene expression levels. The qRT-PCR reactions were run in duplicate and the normalization of the results was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2011). The number of animal used for gene expression analyses was G1: n=4, G2: n= 7, G3 or G4: n= 08.

4.4 Statistical Analysis

Body and organ weights, water and food consumptions were compared between the experimental groups using the *t test*. The incidences of urinary bladder lesions by LM and SEM were compared by the Fisher exact test. Gene expressions were compared by the non-parametric Mann–Whitney test. The gene expression correlation was analyzed by the Pearson's correlation coefficient and the Kaplan-Meier survival curves were compared by the Log-Rank test. Differences were considered significant at $p<0.05$. The statistical analyses were performed using GraphPad InStat -[DATASET1.ISD] and Statistical Analysis System (SAS) V. 9.3.

5.0 RESULTS

The diuron-fed animals had survival rates similar to the controls, i.e., G1: 100%, G2: 100%, (20 weeks), G3: 60%, and G4: 52% (84-weeks) (Supplementary Figure S1). Therefore, the mortality of diuron-fed animals was probably due to natural causes of this strain of rats (Bomhard et al., 1992) and was unrelated to the treatment. The incidences of spontaneous tumors in those rats are described in Supplementary Table S1. Due to autolysis, the urinary bladders of these rats could not be analyzed.

The decrease in the body weight gain compared to control was around 6% in both experimental periods, indicating that the diuron concentration used in this study did not influence the body weight. In general, no differences were observed in organ weights neither in water consumption by animals from diuron groups compared to controls. However, the rats fed diuron for 20 weeks (G2) showed a reduction of food consumption compared to control group (G1) ($p<0.05$). This reduction in food consumption did not influence the body weight gain neither the levels of the diuron intake, and it was probably due to palatability of the substance (Table 1).

The relative kidney and liver weights were similar to the control groups (Table 2). The mean relative spleen weight of the animals exposed to diuron (G2 and G4) was significantly increased compared to the respective controls (G1 and G3) (Table 2). It is well known that herbicides derived from urea can induce methaemoglobinaemia, a condition caused by elevated levels of

methaemoglobin in the blood, related with splenomegaly, congestion in splenic red pulp, and depletion of the splenic white pulp, conditions widely recognized as diuron-induced (Wang et al., 1993; USEPA, 2003; APVMA, 2005; Domingues et al., 2012; Cardoso et al., 2013).

The effect of diuron 500ppm on mRNA expressions of *Tgfb1*, *Nfe2l2*, *Ugt1a6*, *Gstm1*, *Gpc3* genes in the urinary bladder epithelium of rats exposed for 20 or 84 weeks is depicted in Table 3. Independently of the exposure time length, the expression of *Ugt1a6* was increased in the diuron-treated groups (G2 and G4) compared to the respective controls (G1 and G3). The expression of *Gpc3* was reduced after 84 weeks ($p = 0.02$). Although not statistically significant, there was a trend for decreased expression of this gene on the 20-week exposure ($p = 0.07$).

The increased *Nfe2l2* gene expression was observed in diuron group (G2) only in the 20-week exposure period. In both experimental periods, a positive correlation was observed between *Nfe2l2* and *Gstm1* gene expressions. No difference between the groups (G1 vs G2 and G3 vs G4) was observed in the *Tgfb1* and *Gstm1* expressions.

The urothelial morphological changes induced by diuron exposure are described in Table 4. No histological lesion was observed in the urinary bladder from the 20-week exposure animals (G1 and G2 groups). In the 84th week, the animals fed diuron (G4) showed increased incidences ($p<0.05$) of urothelial SH in the urinary bladder (10/18) and kidney pelvis (23/25) compared to their

respective controls (G3) (2/22 and 9/30) (Figure 2). The SH was severe in the bladder epithelium of two (2) rats and in the kidney pelvis of one (1) rat, and moderate in the kidney pelvis of 13 rats. In general, the urothelial morphological changes observed in the kidney pelvis were similar to those seen in the urinary bladder. By SEM, although no significant, the incidence of ultrastructural urothelial changes was increased in the diuron treated G2 (3/8) and G4 (4/6) when compared to their respective controls G1 (1/10) and G3 (2/6), regardless of the exposure time (Figure 3).

6.0 DISCUSSION

Urothelial transcriptional changes after seven days (Ihlaseh-Catalano et al., 2014) and hyperplasia after 20 weeks induced by 500ppm diuron (Cardoso et al., 2013) have raised concern about the potential carcinogenicity of this dietary concentration in long-term experimental studies. The present study represents the longest period of exposure in which the transcriptional and morphological effects induced experimentally by 500ppm diuron concentration has been evaluated.

In this work, in the 20-week diuron fed animals, the LM did not show proliferative changes in the urinary bladder and by SEM, a low incidence of ultrastructural urothelial changes was seen. The increase in incidence and severity by LM after 84 weeks of diuron exposure showed that even at concentrations lower than 2500ppm, as 500ppm, diuron maintains its cytotoxic potential and induces the development of hyperplasia and regenerative proliferation. The presence of moderate/severe urothelial SH in the urinary bladder and kidney pelvis in diuron-fed animals after 84 weeks of exposure and SH characterized by class 5 in the SEM suggests a progression of the lesions over the time. This hypothesis has been supported by the absence of severe lesions in previous studies with higher concentrations of diuron (1250ppm, 2500ppm) after 15 or 20 weeks of exposure (Nascimento et al., 2006; da Rocha et al., 2010; Cardoso et al., 2013; Fava et al., 2015) and the absence of lesions at 20 weeks in the present study.

The postulated non-genotoxic carcinogenic MOA for diuron in the rat urinary bladder is metabolic activation, cytotoxicity with consequent regenerative proliferation leading to hyperplasia and ultimately tumors (da Rocha et al., 2014). The necrosis induction by diuron exposure appears to be related to several signaling pathways, including stress-related genes such as those that control *Nrf2*-mediated oxidative stress response, glutathione metabolism and xenobiotic metabolism (Ihlaseh et al., 2011). Molecular perturbations in these functions were also found in our study, specifically, in the *Nfe2l2* and *Ugt1a6* genes expression, which are related to oxidative stress and xenobiotic metabolism pathways, respectively.

The importance of proteins with detoxification activities such as UDP-glucuronosyltransferases enzymes (*Ugts*) or glutathione S-transferase (*Gst*) in the development of urinary bladder cancer has been widely described (Lukas et al., 2017; Sundararaghavan et al., 2017). In general, the decrease in the synthesis of these proteins is associated with increased susceptibility to development of urothelial carcinomas. Then, an activity reduction of the detoxifying enzymes could increase the availability of reactive compounds in the urine, allowing greater interaction with the urothelial cells, providing a favorable environment for cytotoxicity installation and induction of lesions (Lukas et al., 2017; Sundararaghavan et al., 2017). The present study showed an increase in the *Ugt1a6* gene expression in the diuron-fed animals, regardless of exposure time, probably due to the greater need for xenobiotic

metabolism.

Gstm1 is a gene involved in the glutathione metabolism pathway. *Gstm1* negative genotypes have been reported in patients with urinary bladder cancer (Lukas et al., 2017). This gene was over-expressed after 20 weeks of exposure in the carcinogenic concentration of 2500ppm diuron (Ihlaseh et al., 2011). However, in the present study, no difference was observed in the *Gstm1* expression after 20 or 84 weeks of exposure. This absence of *Gstm1* expression changes in the rat urothelium suggests that 500ppm diuron was not enough to induce alteration after 20 weeks of exposure, and that this gene was not involved with urothelial lesions diuron-induced after 84 weeks.

The *Nfe2l2* is a gene involved in regulation of genes with detoxifying functions against ROS (Reszka et al., 2014). This is relevant because the oxidative stress can contribute substantially to the development of urothelial carcinogenesis (Whongsiri et al., 2018). In a previous 20-week experiment, the increased expression of transcripts related to oxidative stress mediated by *Nfe2l2* was observed with all diuron concentrations 60, 125, 1250 and 2500ppm (Ihlaseh et al., 2011). In this study, we also observed an increase of *Nfe2l2* gene expression only after 20 weeks of 500ppm diuron exposure. This observation suggests that the alteration in the expression of this gene may be related to intermediate transcriptional changes induced by this herbicide and there must have occurred an adaptive response of the urothelium between

the 20th and the 84th week. There was also, a positive correlation between *Nfe2l2* and *Gstm1* gene expressions, regardless of the exposure time. This was already expected since *Nfe2l2* is an important regulator of Phase II enzymes (Iida et al., 2007).

Previously, Ihlaseh-Catalano et al. (2014) reported that *Tgfb1* was the most significant predicted upstream regulator of the transcriptional response observed in 500ppm and 2500ppm diuron-exposed groups after seven days of dietary exposure. However, the expression of this gene was not altered in animals fed diuron at 60, 125, 1250 or 2500ppm after 20 weeks (Ihlaseh et al., 2011). The *Tgfb1* product is a multifunctional cytokine related with urothelial carcinomas in humans (Olfat-Shaker et al., 2013) and is involved in biological activities such as cell proliferation, growth, differentiation, production of extracellular matrix components, and chemotaxis (Kajdaniuk et al., 2013). These biological processes appear to be related only to the early urothelial changes induced by this herbicide. Consistent with Ihlaseh et al., 2011 findings, we also did not observe alterations in *Tgfb1* expression after medium and long-term diuron 500ppm exposure.

Finally, *Gpc3*, a gene involved in the cell proliferation process and possibly in the induction of apoptosis (Gonzalez et al., 1998; Cano-Gauci et al., 1999), was downregulated after seven days (125, 500 and 2500ppm) and 20 weeks (60, 125, 1250 and 2500ppm) of diuron exposure (Gomide et al., *in submission*). In the present study, we also observed decreased expression of

this gene in both experimental periods. Although, this decrease was not statistically significant at the 20-week period, there was a trend towards the significance ($p=0.07$). The decreased expression of this gene in previous studies at all diuron concentrations after seven days or 20 weeks of exposure (Gomide et al., *in submission*) and also, in this work after 20 and 84 weeks of diuron 500ppm treatment suggests that this transcriptional change is related to diuron exposure, regardless time or concentration.

7.0 CONCLUSIONS

The present data documented transcriptional and morphological urothelial changes induced by diuron 500ppm after 20 or 84 weeks of exposure.

The persistence of the chemical stimulus for longer period was necessary for the development and increased severity of the lesions. This time-response relationship was also observed in the *Ugt1a6* gene expression, which was more up-regulated at 84 weeks.

Changes in the *Tgfb1* gene expression appears to be unrelated to diuron-induced cytotoxicity in 20 or 84 weeks. The absence of alterations in *Nfe2l2* expression at the 84th week suggests that an adaptive response of urothelium occurred between the 20th and 84th week of diuron exposure.

The early termination of the experiment in the 84th week (19 months) did not allow evaluating the two years of carcinogenicity study of 500ppm diuron concentration but showed the progression of the lesions.

Our results suggest that a long-term 500ppm diuron dietary exposure was cytotoxic and able to induce urothelial hyperplasia and gene expression changes, and, therefore, this concentration may be considered as the lowest observable adverse effect level (LOAEL) for long exposure in rats. These findings are relevant to the risk assessment of diuron due to the proximity of 500ppm diuron concentration with the currently accepted NOAEL of 250ppm.

8.0 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The employment affiliation of each author is shown on the cover page. With the exception of the author Shadia Muhammad Ihlaseh Catalano, who has become employee of private chemical company- BASF - all the other authors were associated with academic institutions when the paper was prepared.

None of the authors has appeared before regulatory agencies or participated in legal proceedings concerned with safety of diuron.

9.0 FUNDING

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Grant No. 2015/11628-6 and technical training scholarship. No. 2016/22955-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Ph.D. scholarship N°. 14306/2014-5, and Center for the Evaluation of the Environmental Impact on Human Health (TOXICAM), Department of Pathology and Department of Pathology, São Paulo State University (UNESP) Medical School, Botucatu, SP, Brazil.

10 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Fábio Bossoi Vicente from the Department of Physics of UNESP's Bauru School of Sciences, SP, Brazil, Electron Microscopy Center of the Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. We Thank you too Sandra Aparecida Drigo Linde from NeoGene Laboratory, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil for providing helpful in the correlation gene expression analyses. We Thank you too Rodrigo Mattos dos Santos and Igor de Carvalho Deprá from UNIPEX, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil for providing helpful in the gene expression procedures. Paulo Roberto Cardoso, Paulo Cesar Georgete, and Cristina Aparecida Alquati Dorico (TOXICAM Laboratory) from Department of Pathology of Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil for providing helpful technical assistance. We are grateful to Dr. Samuel Cohen, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA, for reviewing the manuscript.

11. REFERENCES

APVMA, 2005 Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority. The reconsideration of approvals of the active constituent diuron, registrations of products containing diuron and their associated labels. Tech. Assess. Rep. 2, 40.

Bevan, R. J; Harrison, P.T.C.; 2017. Threshold and non-threshold chemical carcinogens: A survey of the present regulatory landscape. Regul Toxicol Pharmacol. 88, 291-302.

Bhat, V. S., 2014. Benchmark Dose-Response Modeling Approaches to Integrate Toxicogenomics Into Quantitative Risk Assessment. Riverside Electronic Theses and Dissertations: <https://escholarship.org/uc/item/3w1833xx>

Bomhard, E., 1992. Frequency of spontaneous tumors in Wistar rats in 30-months studies. Exp Toxicol Pathol. 44, 381-92.

Cano-Gauci, D.F., Song, H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., et al., 1999. Glypican-3-deficient mice exhibit the overgrowth and renal abnormalities typical of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. J. Cell.Biol. 146, 225-264.

Cardoso, A.P., Ihlaseh Catalano, S.M., da Rocha, M.S., Nascimento e Pontes, M.G, de Camargo, J.L, de Oliveira, M.L., 2013. Dose-response of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in the urothelial mucosa of Wistar rats. Toxicology. 312,1-5.

Cohen, S.M., Ohnishi, T., Clark, N.M., He, J., Arnold, L.L., 2007. Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. Toxicol. Pathol. 35, 337–347.

Cohen, S. M, Chowdhury, A., Arnold, L.L, 2016. Inorganic arsenic: A non-genotoxic-carcinogen. J Environ Sci (China). 49, 28-37.

Dai, Y.C., Wang, S.C., Haque, M.M., Lin, W.H., Lin, L.C., Chen, C.H., Liu, Y.W., 2017. The interaction of arsenic and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine on urothelialcarcinogenesis in mice. PLoS One. 12, 10-12.

Domingues, A., Grassi, T.F., Spinardi-Barbisan, A.L., Barbisan, L.F., 2012. Developmental exposure to diuron causes splenotoxicity in male Sprague-Dawley rat pups. J. Environ. Sci. Health B 47, 420–426.

European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Draft assessment report (DAR) Diuron – Toxicology and metabolism. Volume 3, Annex B6, pp. 367.

Fava, R.M., Cardoso, F. P. A., da Rocha, S. M., Nascimento e Pontes, M. G., de

Camargo, J. L. V., de Oliveira, M. L. C. S., 2015. Evaluation of early changes induced by diuron in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. *Toxicology*.333, 100-106.

Giuliani, L., Ciotti, M., Stoppacciaro, A., Pasquini, A., Silvestri, I., De Matteis, A., Frati, L., Agliano, A. M. 2005. UDP-glucuronosyltransferases 1A expression in human urinary bladder and colon cancer by immunohistochemistry. *Oncol Rep*. 13, 185,191.

Gomide, L. M. M., Ihlaseh – Catalano, S. M., Rosa, F. E., Wolf, D. C., not published. The Glypican 3 (Gpc3) gene is involved in the early urothelial citotoxicity induced in the rat by the herbicide diuron.

Gonzalez, A. D., Kaya, M., Shi, W., Song, H., Testa, J.R., Penn, L.Z., Filmus, J., 1998. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol*. 141, 1407-1414.

Ihlaseh, S.M., Bailey, K.A., Hester, S.D., Jones, C., Ren, H., Cardoso A.P., Oliveira, M.L., Wolf, D., de Camargo, J.L. 2011. Transcriptional profile of diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. *Tox.Sci*. 122, 330-338.

Ihlaseh-Catalano, S. M, Bailey, K., Cardoso, A. P. F., Ren, H., Fry, R. C., de Camargo, J. L. V., Wolf, D. C. 2014. Dose and temporal effects on gene expression profiles of urothelial cells from rats exposed to diuron. *Toxicology*. 325, 21-30.

Iyer, P., 2002. Evidence on the development and reproductive toxicity of diuron. Draft. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section. Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, 43.

Kajdaniuk, D., Marek, B., Borgiel-Marek, H., Kos-Kudła, B., 2013. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol*. 64, 384-396.

Livak, K.J. and Schmittge, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*. 25, 402 - 408.

Lukas, C., Selinski, S., Prager, H.M.,Blaszewicz, M., Hengstler, J.G., Golka, K., 2017. Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis. *J Toxicol Environ Health*, 80, 439-452.

Narayan, S., Thangasamy, T., Balusu, R., 2005. Transforming grown factor-beta receptor signaling in cancer. *Front Biosci*. 10, 1135- 1145.

Nascimento, M.G., de Oliveira, M.L., Lima, A.S., de Camargo, J.L., 2006. Effects of Diuron [3-(3, 4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology*. 224, 66-73.

Olfat Shaker, M.D., Olfat Hammam, M.D., Mohamed Wishahi, M.D., Mamdouh Roshdi, M.D., 2013. TGF-B1 pathway as biological marker of bladder carcinoma schistosomal and non-schistosomal. *Urologic Oncology*. 31, 372- 378.

Oturan, N., Trajkovska, S., Oturan, M.A., Couderchet, M., Aaron, J.J., 2008. Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process electro-Fenton. *Chemosphere* 73, 1550–1556.

Reszka, E., Jablonowski, Z., Wieczorek, E., Jablonska, E., Krol, M. B., Gromadzinska, J., Grzegorzczak, A., Sosnowski, M., Wasowicz, W., 2014. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 140, 1723–1731.

da Rocha, M.S., Nascimento, M.G., Cardoso, A.P., de Lima, P.L., Zelandi, E.A., de Camargo, J.L., de Oliveira, M.L., 2010. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicol Sci*. 113, 37–44.

da Rocha, M.S., Arnold, L.L., Pennington, K.L., Muirhead, D., Dodmane, P.R., Anwar, M.M., Battalora, M., de Camargo, J.L., Cohen, S.M., 2012. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Toxicol. Sci*. 130, 281–288.

da Rocha, M.S., Arnold, L.L., Dodmane, P.R., Pennington, K.L., Qiu, F., de Camargo, J.L., Cohen, S.M., 2013. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology*. 314, 238-246.

da Rocha, M.S., Arnold, L.L., de Oliveira, M.L., Catalano, S.M., Cardoso, A.P., Pontes, M.G., Ferrucio, B., Dodmane, P.R., Cohen, S.M., de Camargo, J.L., 2014. Diuron-induced rat urinary bladder carcinogenesis: mode of action and human relevance evaluations using the international Program on Chemical Safety framework. *Crit. Rev. Toxicol*. 44, 393- 406.

Sundararaghavan, V.L., Sindhwani, P.2., Hinds, T.D. 2017. Glucuronidation and UGT isozymes in bladder: new targets for the treatment of uroepithelial carcinomas? *Oncotarget*. 10, 3640-3648

U.S. Environmental Protection Agency., 1997. Carcinogenicity peer review of diuron: Office of Prevention, Pesticides and Toxic substances. [Memorandum]. Cincinnati, 22p.

U.S. Environmental Protection Agency., 2003. Registration Eligibility Decision for Diuron. List A. Case 0046. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. USEPA, Washington, DC.

Wang, S. W., Chu, C. Y., Hsu, J. D., Wang, C.J., 1993. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem*

Toxicol. 31, 285-95.

Whongsiri, P., Phoyen, S., Boonla, C., 2018. Oxidative Stress in Urothelial Carcinogenesis: Measurements of Protein Carbonylation and Intracellular Production of Reactive Oxygen Species. *Methods Mol Biol.* 1655, 109-117.

12. TABLES

Table 1: Mean of body weights and ingested level of food and water during the experiment and estimated dose of diuron.

Experimental periods	Groups	Body weights (g)			Consumption		
		Initial	Final	Gain	Water (ml/rat/day)	Food (g/rat/day)	Diuron (mg/rat/day)
20 weeks	G1	254±16 (16) ¹	579±40 (16)	325±76	39	26	--
	G2	252±13 (16)	558±35 (16)	307±89	39	25 ^a	12
84 weeks	G3	205± 13 (50)	638± 40 (26)	433±39	32	26	--
	G4	204 ±2 (50)	614± 86 (30)	410±23	33	26	13

¹ Effective number of animals; Values are expressed as mean ±S.D., t-test (p < 0.05).

G1: Control group, G2: Diuron 500ppm group, G3: Control group, G4: Diuron 500ppm group.

^a Different from control.

Table 2: Final body weights, liver, kidney and spleen absolute and relative weights of male Wistar rats exposed to diuron at different experimental periods.

Experimental periods	Groups	N	Final body weight (g)	Absolute weights (g)			Relative weights (g)		
				Liver	Kidneys	Spleen	Liver	Kidneys	Spleen
20 weeks	G1	16	579±39	17.4±1.4	3.4±0.4	1.2±0.1	3.0±0.2	0.6±0.0	0.2±0.2
	G2	16	558±35	17.9±1.5	3.5±0.4	1.4±0.1 ^a	3.2±0.2	0.6±0.6	0.3±0.2 ^a
84 weeks	G3	26	638± 40	16.9±2.8	3.5±0.5	1.6±0.4	2.7±0.4	0.5±0.1	0.2±0.1
	G4	30	614± 86	17.4±2.5	3.6±0.7	1.8±0.5	2.9±0.4	0.6±0.1	0.3±0.1 ^a

N : effective number of animals; Values are expressed as mean ±S.D., t-test (p < 0.05).

G1: Control group, G2: Diuron 500ppm group, G3: Control group, G4: Diuron 500ppm group.

^a Different from control.

Table 3: mRNA expression of *Tgfb1*, *Nfe2l2*, *Ugt1a6*, *Gstm1*, *Gpc3* genes in urothelial cells of Wistar rats after 20 or 84 weeks of diuron 500ppm exposure.

Experimental periods	Groups	N	Relative expression mRNA				
			<i>Tgfb1</i>	<i>Nfe2l2</i>	<i>Ugt1a6</i>	<i>Gstm1</i>	<i>Gpc3</i>
20 weeks	G1	04	1.3 (0.4- 1.7)	1.0 (0.7-1.3)	1.0 (0.8 -1.3)	0.8 (0.8-1.7)	1.0 (1.0-1.1)
	G2	07	1.4 (1.0- 2.3)	1.4 (1.1-1.8)^{b, c}	1.5 (1.0 -2.5)^b	1.7 (0.8-2.6) ^c	0.7 (0.4-1.3)
84 weeks	G3	08	1.0 (0.8 -1.3)	1.1 (0.5 -1.6)	1.0 (1.9 -0.7)	1.0 (0.7 -1.6)	1.1 (0.4 -1.5)
	G4	08	0.9 (0.4 -1.2)	0.9 (0.2 -1.7) ^d	2.5 (0.4 -3.1)^b	1.2 (0.3 -2.7) ^d	0.8 (0.4 -1.0)^b

N : effective number of animals; Values are expressed as median and Interquartile Range., Man-Whitney test (p < 0.05).

G1: Control group, G2: Diuron 500ppm group, G3: Control group, G4: Diuron 500ppm group.

^a Relative expression - 2^{-ΔΔCt} according (Livak & Schmittge, 2011)

^b Different from control.

^c Pearson correlation (*Nfe2l2* and *Gstm1*) R: 0.653 and P: 0.003

^d Pearson correlation (*Nfe2l2* and *Ugt1a6*) R: 0.9111 and P: 0.001

Table 4: Effects of 500ppm diuron dietary exposures on the urothelial mucosa of urinary bladder and kidney pelvis of male Wistar rats at different experimental periods.

Experimental periods	Groups	Incidence and severity of SH ^b in urinary bladder mucosa ^a					Urinary bladder classes of increased severity of urothelial alterations (SEM) ^{a, c}					Incidence of SH ^b in kidney pelvis mucosa ^a				
		N	mild	moderate	severe	total	N	1-3	4	5	Total (4-5)	N	mild	moderate	severe	total
20 weeks	G1	12	0	0	0	0	10	9	1	0	1	16	1	0	0	1
	G2	8	0	0	0	0	8	5	1	2	3	16	5	0	0	5
84 weeks	G3	22	2	0	0	2	6	4	0	2	2	30	9	0	0	9
	G4	18	8	0	2	10^d	6	2	0	4	4	25	9	13	1	23^d

^aValues expressed per animal, Fisher's exact test (2-tail) (p < 0.05).

G1: Control Group, G2: Diuron 500ppm group, G3: Control Group, G4: Diuron 500ppm group.

^b Simple hyperplasia, minimal (4- 5 cells layers), moderate (6 – 8 cell layers), severe (more than 8 cell layers) (Cohen et al., 2007).

^cClasses 1–3: normal urothelium, Classes 4-5: increased severity of urothelial alterations (Cohen et al., 2007).

^d Significantly different from control (p < 0.05).

13. FIGURES

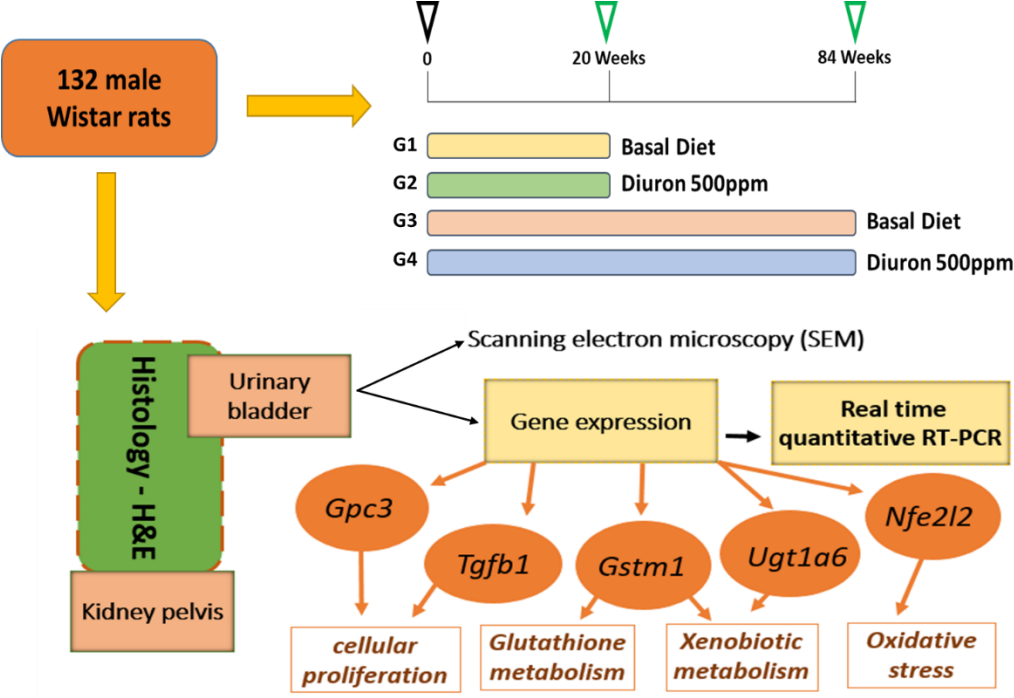


Figure 1: Experimental design

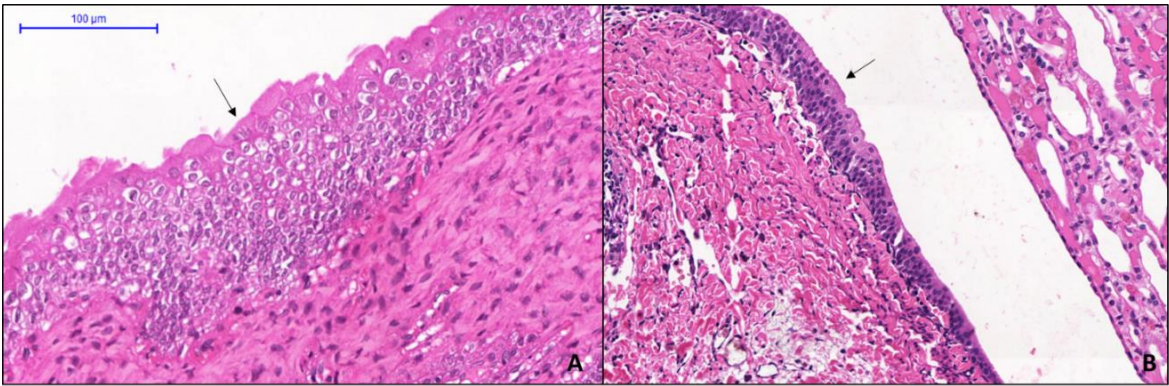


Figure 2: Histology of diuron 500ppm exposure animals (A) Urinary bladder showing severe simple hyperplasia (more than 8 layers) (arrow) 40x, (B) kidney pelvis moderate (6 to 8 layers) simple hyperplasia (arrow) 20x.

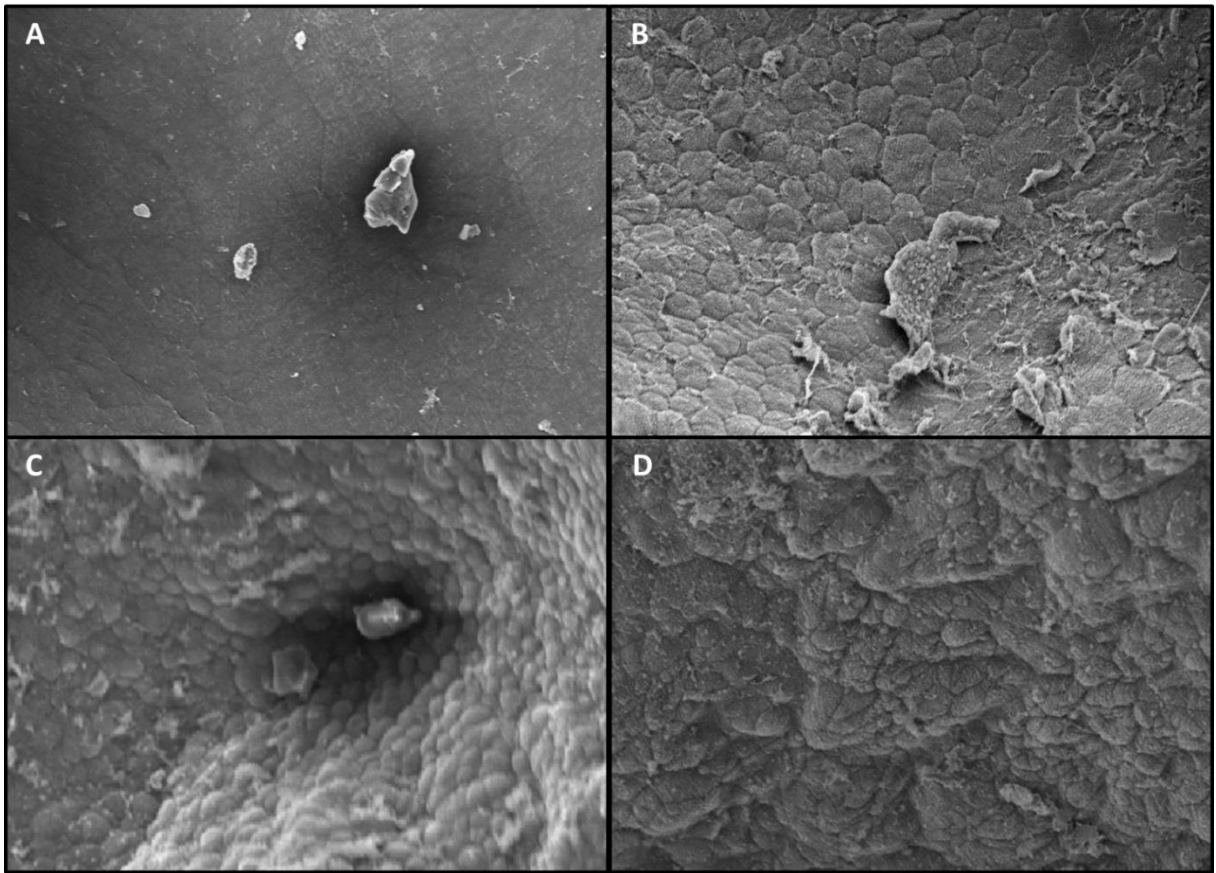


Figure 3: Scanning electron microscopy: (A) Normal urothelium of control group in 20 weeks study (600x), (B) Urothelial exfoliation of diuron group after 20 weeks (300x), (C) urothelial hyperplasia of diuron group after 20 weeks (300x) and (D) 84 weeks (365x).

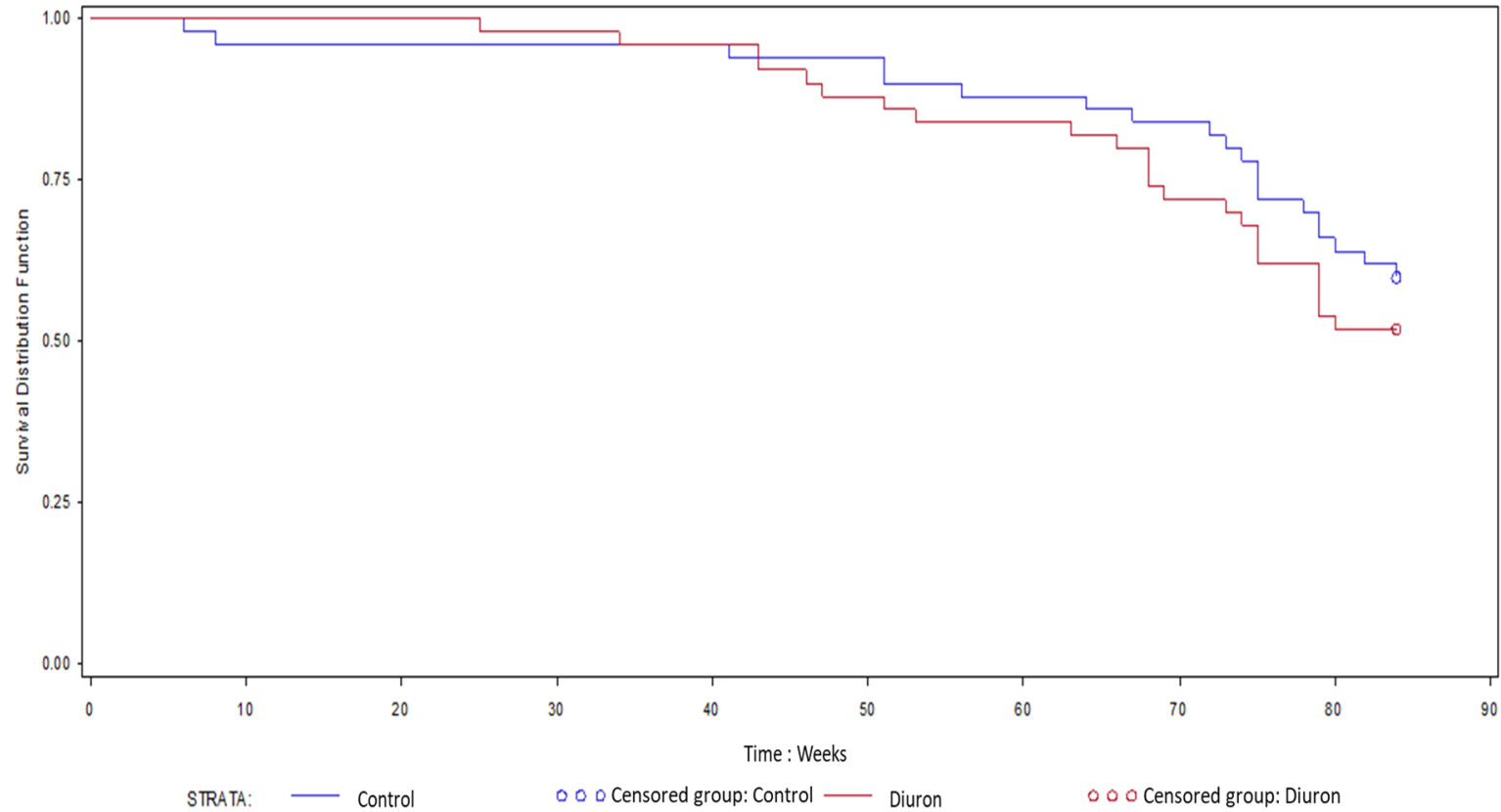


Figure S1: Kaplan-Meier survival curves by log-Rank test ($p=0.36$ not significant)

Table S1: Site of spontaneous tumors in rats that died during the experiment:

Animal group	N	Week of experiment	Tumor site	Histopathology
500ppm diuron	01	68	Lung	Abscess
Control	01	72	Left Kidney	Mesenchymal tumor
500ppm diuron	01	74	Liver	Hepatocellular carcinoma
500ppm diuron	01	74	Mouth	Abscess
Control	01	75	Peritoneum	Low grade myxedematosus fibrosarcoma
500ppm diuron	01	80	Liver	Hepatocarcinoma
500ppm diuron	01	80	Intestine	Adenocarcinoma

The mortality of diuron-fed animals was unrelated to treatment, but to the natural causes in this strain of rats (Bomhard et al., 1992). N: number of animals.

Apêndices

Tabela 1: Mortalidade e taxa de sobrevida de ratos Wistar expostos ao diuron no período de 84 semanas:

DATA DA MORTALIDADE	SEMANA DE ESTUDO	CONTROLE NUMERO EFETIVO DE ANIMAIS=50	CONTROLE MORTALIDADE N	TAXA DE SOBREVIDA (%)	DIURON NUMERO EFETIVO DE ANIMAIS=50	DIURON MORTALIDADE N	TAXA DE SOBREVIDA (%)
03/11/14*	1	50	-	100	50	-	100
10/12/14	6	49	1	98	50	-	100
22/12/14	8	48	1	96	50	-	100
20/04/15	25	48	-	96	49	1	98
28/06/15	34	48	-	96	48	1	96
14/08/15	41	47	1	94	48	-	96
24/08/15	43	47	-	94	47	1	94
28/08/15	43	47	-	94	46	1	92
19/09/15	46	47	-	94	45	1	90
24/09/15	47	47	-	94	44	1	88
19/10/15	51	46	1	92	44	-	88
22/10/15	51	45	1	90	43	1	86
03/11/15	53	45	-	90	42	1	84
27/11/15	56	44	1	88	42	-	84
11/01/16	63	44	-	88	41	1	82
22/01/16	64	43	1	86	41	-	82
01/02/16	66	43	-	86	40	1	80
08/02/16	67	42	1	84	40	-	80
15/02/16	68	42	-	84	39	1	78
19/02/16	68	42	-	84	37	2	74
22/02/16	69	42	-	84	36	1	72
15/03/16	72	41	1	82	36	-	72
22/03/16	73	41	-	82	35	1	70
24/03/16	73	40	1	80	35	-	70

Apêndices

28/03/16	74	39	1	78	35	-	70
01/04/16	74	39	-	78	34	1	68
06/04/16	75	37	2	74	32	2	64
08/04/16	75	36	1	72	31	1	62
29/04/16	78	35	1	70	31	-	62
02/05/16	79	35	-	70	30	1	60
09/05/16	79	33	2	66	27	3	54
18/05/16	80	32	1	64	27	1	54
23/05/16	81	32	-	64	26	-	52
29/05/16	82	31	1	62	26	-	52
06/06/16	84	30	1	60	26	-	52
TOTAL	84	30	20	60	26	24	52

N= Número de animais, *Data início do estudo: 03/11/2014

Apêndices

Tabela 2: Concentração de RNA (ng/μl) extraído das células uroteliais de ratos Wistar expostos ao diuron por 20 ou 84 semanas:

Identificação da amostra	Grupo experimental	Contaminação por proteínas ^a	Concentração de RNA ng/μl ^b
02	G1	2,09	991,69
06	G1	2,06	985,05
20	G1	2,06	561,26
19	G1	2,06	346,06
39	G1	2,04	488,27
40	G1	2,08	796,33
44	G1	2,08	566,43
48	G1	2,07	499,26
51	G2	2,10	863,26
61	G2	2,04	672,19
66	G2	2,07	671,82
68	G2	2,06	615,13
70	G2	2,05	689,50
79	G2	2,05	723,85
90	G2	2,04	203,82
92	G2	2,07	692,73
104	G3	2,01	693,23
108	G3	2,07	274,03
112	G3	2,09	1027,16
116	G3	1,80	493,23
119	G4	2,08	451,87
123	G4	2,10	979,63
127	G4	2,06	332,03
131	G4	2,06	395,95
132	G4	2,06	288,43

^a Valores de referência para uma amostra livre de contaminação de proteínas – aproximadamente 2,0.

^b Para a obtenção do cDNA a concentração das amostras foi uniformizada.

Apêndices

Tabela 3: Média de peso corpóreo de ratos Wistas expostos ao diuron 500ppm por 20 semanas:

Grupos	Peso corpóreo (g) $\pm$ DP											
	S1	S2	S3	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
G1	205,3	257,1	300,7	347, 7	401,6	444,6	475,6	504,9	531,25	543,25	556, 25	573,1
DP	$\pm 13,38$	$\pm 14,40$	$\pm 28,88$	$\pm 16,31$	$\pm 16,76$	$\pm 19,97$	$\pm 24,84$	$\pm 25,63$	$\pm 30,24$	$\pm 33,31$	$\pm 36,33$	$\pm 40,12$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
G2	203,6	257,6	303,5	342,8	394,3	432,7	466,37	486,1	511, 06	515,0	535,62	555,6
DP	$\pm 20,34$	$\pm 19,70$	$\pm 23,86$	$\pm 25,40$	$\pm 27,56$	$\pm 30,61$	$\pm 30,55$	$\pm 34,69$	$\pm 28,91$	$\pm 31,76^a$	$\pm 32,32$	$\pm 28,63$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Valores expressos em média $\pm$ Desvio Padrão (DP); teste *t* Student; ($p < 0,05$); S. (semana do experimento),

G1: Grupo controle; G2: Grupo diuron 500ppm; N: número de animais.

^a Diferente do controle

Tabela 4: Consumo de água de ratos Wistar expostos ao diuron 500ppm por 20 semanas:

Grupos	Consumo médio de água (ml) $\pm$ DP											
	S1	S2	S3	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
G1	32,00	32,60	39,35	40,70	38,31	40,68	41,67	40,64	43,14	46,21	36,81	38,79
DP	$\pm 0,52$	$\pm 3,34$	$\pm 1,77$	$\pm 3,08$	$\pm 1,94$	$\pm 3,56$	$\pm 4,37$	$\pm 3,93$	$\pm 2,60$	$\pm 3,99$	$\pm 1,26$	$\pm 2,68$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
G2	32,90	37,60	40,48	41,5	39,15	38,17	40,21	39,34	40,32	46,18	34,96	36,31
DP	$\pm 0,97^a$	$\pm 1,36^a$	$\pm 1,53$	$\pm 1,76$	$\pm 1,60$	$\pm 3,70$	$\pm 1,10$	$\pm 2,14$	$\pm 2,58^a$	$\pm 4,95$	$\pm 2,36^a$	$\pm 1,29^a$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Valores expressos em média $\pm$ Desvio Padrão (DP); teste *t* Student; ($p < 0,05$); S. (semana do experimento),

G1: Grupo controle; G2: Grupo diuron 500ppm; N: número de animais.

^a Diferente do controle

Apêndices

Tabela 5: Consumo de ração de ratos Wistar expostos ao diuron 500ppm por 20 semanas:

Grupos	Consumo médio de ração (g) $\pm$ DP											
	S1	S2	S3	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
G1	23,43	25,35	27,76	27,5	27,32	27,48	25,65	26,73	26,14	23,60	26,81	27,81
DP	$\pm 0,72$	$\pm 0,99$	$\pm 1,13$	$\pm 1,37$	$\pm 0,82$	$\pm 0,25$	$\pm 1,10$	$\pm 1,8$	$\pm 0,53$	$\pm 0,62$	$\pm 0,78$	$\pm 1,03$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
G2	21,54	24,98	26,95	25,43	25,32	24,89	22,64	23,39	25,10	23,70	25,29	26,28
DP	$\pm 0,39^a$	$\pm 0,62$	$\pm 0,22^a$	$\pm 0,36^a$	$\pm 0,93^a$	$\pm 1,01^a$	$\pm 1,02^a$	$\pm 0,36^a$	$\pm 0,96^a$	$\pm 2,83$	$\pm 0,81^a$	$\pm 0,88^a$
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

Valores expressos em média $\pm$ Desvio Padrão (DP); teste *t* Student; ($p < 0,05$); S. (semana do experimento),

G1: Grupo controle, G2: Grupo diuron 500ppm; N: número de animais.

^a Diferente do controle

Apêndices

Tabela 6: Média de peso corpóreo de ratos Wistar expostos ao diuron 500ppm por 84 semana

Grupos	Peso corpóreo (g) ± DP																	
	S. 1	S. 3	S.4	S.5	S.7	S.9	S. 11	S.13	S.15	S.17	S.20	S.25	S.29	S.33	S.37	S.41	S.46	S.49
G3	253,0	329,5	367,0	388,3	415,7	447,7	472,0	496,7	512,16	519,0	546,9	562,6	582,4	588,9	601,5	621,83	636,2	637,4
DP	±13,8	±17,4	±23,0	±27,6	±28,3	±31,1	±35,0	±38,2	±42,9	±42,1	± 45,1	±47,4	±49,8	±52,5	±54,5	±59,6	±60,0	±61,7
N	50	50	50	50	49	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	47	47
G4	249,3	322,8	355,0	375,5	406,7	427,6	457,5	482,5	501,6	510,0	537,8	548,9	573,1	579,8	582,5	593,0	591,6	615,1
DP	±14,6	±17,9	±17,2^a	±22,5^a	±20,9	±33,5^a	±32,2^a	±32,3^a	±39,6	±40,2	±45,7	±47,0	±52,0	±55,0	± 68,0^a	±72,4^a	±96,9^a	±71,3
N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	49	49	49	48	48	46	44

Grupos	Peso corpóreo (g) ± DP							
	S.54	S.58	S.62	S.68	S.71	S.75	S.80	S.84
G3	650,2	656,4	665,1	666,5	655,5	639,9	634,8	651,8
DP	±60,7	±67,5	±71,6	±81,2	±84,7	±100,3	±112,1	±78,8
N	45	44	44	42	42	39	34	30
G4	624,2	626,9	631,0	622,2^a	633,1	638,0	621,2	633,9
DP	±78,5	± 85,3	± 96,8	± 100,4	± 86,6	±86,5	±108,3	±83,9
N	42	42	42	37	36	34	32	26

Valores expressos em média ± Desvio Padrão (DP); teste *t* Student; ($p < 0,05$); S. (semana do experimento),

G3: Grupo controle; G4: Grupo diuron 500ppm; N: número de animais.

N(número efetivo de animais por grupo)^a Diferente do controle

Apêndices

Tabela 7: Consumo de água de ratos Wistar expostos ao diuron 500ppm por 84 semanas:

Grupos	Consumo médio de água (ml) ± DP																	
	S. 1	S. 3	S. 4	S. 5	S. 7	S. 9	S. 11	S. 13	S. 15	S. 17	S. 20	S. 25	S. 29	S. 33	S. 37	S. 41	S. 46	S. 49
G3	36,05	41,6	41,5	36,5	33,31	34,5	32,8	31,3	31,0	30,3	30,8	29,0	36,0	28,8	28,9	30,9	28,9	29,0
DP	±4,4	±6,1	±6,2	±3,0	±2,8	±2,8	±3,3	±3,3	±4,3	±2,6	±3,7	±2,6	±4,4	±2,6	±2,2	±3,0	±2,6	±4,4
N	50	50	50	50	49	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	47	47
G4	36,1	38,4	38,3	37,8	32,6	34,2	33,9	31,1	31,0	32,2	30,5	29,0	36,1	30,0	38,4	27,6	28,5	30,0
DP	±4,3	±4,7	±4,5	±3,4	±4,2^a	±4,0	±4,2	±2,9	±3,4	±4,2	±5,5	±4,4	±4,3	±3,6	±4,0	±3,2^a	±3,6	±4,4
N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	49	49	49	48	48	46	44

Grupos	Consumo médio de água (g) ± DP							
	S. 54	S. 58	S. 62	S. 68	S. 71	S. 75	S. 80	S. 84
G3	28,1	29,6	32,5	29,5	26,5	34,71	31,50	34,10
DP	±4,4	±3,6	±4,1	±3,6	±3,9	±8,56	±10,65	±10,05
N	45	44	44	42	42	39	34	30
G4	29,6	32,4	34,5	30,6	29,6	37,06	31,62	33,27
DP	±6,4	±5,7	±8,5	±6,7	±5,5	±7,80	±8,99	±5,73
N	42	42	42	37	36	34	32	26

Valores expressos em média ± Desvio Padrão (DP); teste t Student; ($p < 0,05$); S. (semana do experimento), N (Número efetivo de animais por grupo)

G3: Grupo controle; G4: Grupo diuron 500ppm;

a Diferente do controle

Apêndices

Tabela 8: Consumo de ração de ratos Wistar expostos ao diuron 500ppm por 84 semanas:

Grupos	Consumo médio de ração (g) ± DP																	
	S. 1	S. 3	S.4	S.5	S.7	S.9	S. 11	S.13	S.15	S.17	S.20	S.25	S.29	S.33	S.37	S.41	S.46	S.49
G3	25,4	36,8	36,7	34,6	27,7	25,7	25,0	24,3	26,5	25,2	25,6	24,9	23,7	24,4	25,4	24,6	25,6	24,6
DP	±1,2	±1,9	±1,9	±3,3	±5,4	±1,2	±2,1	±2,9	±2,9	±2,6	±1,1	±2,5	±1,6	±1,8	±3,5	±2,0	±1,5	±2,7
N	50	50	50	50	49	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	47	47
G4	23,8	34,4	34,3	32,9	26,4	25,0	24,9	25,3	25,6	25,4	24,0	24,2	23,3	27,9	27,0	26,8	24,5	25,1
DP	±0,7^a	±1,3^a	±1,3^a	±1,5	±2,1	±2,2	±2,7	±2,3	±2,4	±1,9	±2,1^a	±1,6	±1,5	±7,8	±3,0	±2,8^a	±3,0	±2,1
N	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	49	49	49	48	48	46	44

Grupos	Consumo médio de ração (g) ± DP							
	S.54	S.58	S.62	S.68	S.71	S.75	S.80	S.84
G3	25,6	23,5	24,3	23,2	21,5	22,35	22,52	25,44
DP	±2,6	±2,5	±2,0	±1,6	±2,1	±5,58	±3,19	±4,85
N	45	44	44	42	42	39	34	30
G4	24,9	27,0	23,5	22,3	22,4	25,71	22,43	22,88
DP	±3,9	±4,8^a	±4,8	± 4,5	±3,4	±3,12^a	±3,79	±7,09
N	42	42	42	37	36	34	32	26

Valores expressos em média ± Desvio Padrão (DP); teste t Student; (p<0,05); S. (semana do experimento), N (Número efetivo de animais por grupo)

G3: Grupo controle; G4: Grupo diuron 500ppm.

^a Diferente do controle



UNIVERSIDADE ESTADUAL "JULIUS DE MESSENBACH"
CAMPUS DE RÍO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA



Faculdade de Medicina
FMB



Coordenação de Ensino e Pesquisa
CETICA

Coordenação de Ensino e Pesquisa
CETICA

CERTIFICADO Nº 1090/2014-CEUA

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1090/2014) Expressão de genes críticos no urotélio vesical de ratos wistar expostos cronicamente ao Diuron, a ser conduzido por Rafaela Marono Favé, orientada pela Profa Dra Maria Luiza Coltrin Saiter de Oliveira, Co-orientada por Mariellen Garcia Nascimento, e colaboração de Ana Paula Ferragut Cardoso, João Lauro Viana de Camargo e Mitscheli Sanches da Rocha, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de "96 ratos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 31/07/2014



Prof. Adjunto Kazushi Okoshi
Presidente da CEUA



Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Diário Rubião Junior, av. - Bonfatti - S.P. CEP: 14.818-070 Fone: (14) 3850-1608/3690-1929 e-mail: secretaria_bonfatti@fmb.unesp.br

Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609

e-mail secretaria: kieber@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 11 de junho de 2015

Of. 26/2015 - CEUA

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Maria Luíza Cotrim Sartor de Oliveira
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Em relação ao Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEUA 1090-2014**) Expressão de genes críticos no urotélio vesical de ratos wistar expostos cronicamente ao Diuron, conduzido por Rafaela Marono Fava, orientada por Vossa Senhoria, coorientada por Merielen Garcia Nascimento, provado em 31/07/2014, informo que as alterações solicitadas foram **AUTORIZADAS**, ficando na seguinte conformidade:

TÍTULO

Título alterado: "Estudo de carcinogenicidade do diuron: Alterações morfológicas e transcricionais induzidas no urotélio de ratos Wistar."

ANIMAIS

Inclusão: Foram adicionadas 36 ratos wistar ao projeto, provenientes do CEMIB-UNICAMP, totalizando 132 animais.

Ao final da execução do projeto é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA

Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970

Fone: (14) 3860-1606/3860-1609

e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 01 de setembro de 2016

OF. 25/2016-CEP

Ilustríssima Senhora
Profa. Dra. Maria Luzia Cotrim Sartor de Oliveira
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Profa. Maria Luiza,

Em relação ao Treinamento: **(Protocolo CEUA 1193-2016) "Treinamento para extração de RNA urotelial de ratos Wistar machos"**, coordenado por Vossa Senhoria, conduzido por Rafaela Marono Fava, informo que foi **AUTORIZADA** a execução do mesmo, na seguinte conformidade:

MODELO ANIMAL	Ratos Wistar
QUANTIDADE	10
PESO	300 gramas
IDADE	20 semanas
VIGÊNCIA	31/01/2017

Ao final do treinamento é necessário enviar o Relatório Final de Atividades para a secretaria da CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA

Anexos



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na
Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB
International Council For Laboratory Animal Science
ICLAS Network Member for Promotion of Animal Quality in Research
www.cemib.unicamp.br



Profª. Drª. Maria Luiza Cotrim Santos de Oliveira
CPF: 039.004.168-55
UNESP
Botucatu - SP

Atestado de Saúde Animal

Atestamos que os Ratos (108 machos) da linhagem HanUnib:WH provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S. (*).

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A Instituição receptora deverá oferecer Infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Toma-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, galotas, tampas, e outros.

(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Setembro de 2014.

Campinas, 14 de outubro de 2014.

Drª. Sônia Cano Montebelo Rachel
CRMV-SP: 4452 - Médica Veterinária
E-mail : soniacmr@cemib.unicamp.br

Prof. Dr. Rowilson Gillol
Diretor do Centro Multidisciplinar para
Investigação Biológica
CEMIB/UNICAMP
E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br

Prof^a. Maria Luiza Cotrin
CPF 039.004.168-85
CNPJ- 48.031.918/0019-53
UNESP
Botucatu - SP

Atestado de Saúde Animal N°361/2016

Atestamos que os Ratos (37 machos) da linhagem HanUnib:WH, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S. (*).

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A Instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Torna-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, gaiolas, tampas, e outros.

(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Setembro de 2016.

Campinas, 10 de outubro de 2016.



Prof. Dr. Rovilson Gilioli
Diretor do Centro Multidisciplinar para
Investigação Biológica
CEMIB/UNICAMP
E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br



Dr. Michel Vaz de Oliveira
CRMV-SP; 16353 - Médico Veterinário
E-mail : michelvaz@gmail.com

Apresentação do trabalho em eventos científicos

XVI Jornada Científica de Toxicologia Agrotóxicos: Ambiente e Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho ESTUDO DE CARCINOGENICIDADE DO DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA NO UROTÉLIO DE RATOS do(s) autor(es) FAVA, RAFAELA MARONO (FMB); SALES, BIANCA CAMARGO PENTEADO (FMB); E PONTES, MERIELEN GARCIA NASCIMENTO (OUTRAS); BENEDITO, OSVALDO LUIS (FMB); SOUZA, NATHÁLIA PEREIRA (FMB); SANTOS, ISABELA POSCIDONIO (FMB); VACCARI, CAROLINA (FMB); IHLASEH-CATALANO, SHADIA MUHAMMAD (OUTRAS); DE CAMARGO, JOÃO LAURO VIANA (OUTRAS); DE OLIVEIRA, MARIA LUIZA COTRIM SARTOR (OUTRAS) foi apresentado, durante a XVI Jornada Científica de Toxicologia, realizada no Espaço IBB de Eventos da UNESP, na categoria Pôster.



Botucatu, 23 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Cesar Martins
Diretor do Instituto de Biociências



Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim
Supervisora do CEATOX

ceatox





**World Toxicologic
Pathology Congress**
April 21st to 26th 2018

Certificate

This is to certify that

Rafaela Fava, Bianca Sales, Osvaldo Benedito, Isabela Santos, Carolina Vaccari, Shadia Catalano, Nathalia Pereira de Souza, João Lauro Viana de Camargo, Maria de Oliveira

presented the poster entitle

Urothelial Changes Induced by 500ppm Diuron Concentration in a Long Term Exposure

at the World Toxicologic Pathology Congress, April 21-26, 2018 at the International Diffusion Center of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil.



Rosy Lara Maciel de Azambuja Ribeiro
Scientific Committee



Maria Lucia Zaidan Dagli
Organizing Committee

Organization and Support



Sponsors





alterations, under the control of SBP-1 and LET-363 proteins.

Financial support / Acknowledgments: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), NIH-USA (National Institutes of Health).

EX 55 - CELL PROLIFERATION IN THE KIDNEY PELVIS OF RATS EXPOSED TO DIURON OR SODIUM SACCHARIN

BENEDITO, O. L. 1; FAVA, R. M. 1; NASCIMENTO E PONTES, M. G. 1; DE CAMARGO J. L. V. 1; DE OLIVEIRA, M. L. C. S. 1.

1 Núcleo de Avaliação do Impacto do Meio Ambiente Sobre a Saúde Humana (TOXICAM), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB- UNESP, São Paulo -SP, Brasil.

Introduction: Evaluation of cell proliferation is an important tool for detection of urothelial cytotoxicity induced by chemicals. The urothelial cell carcinoma (UCC) is a highly incidental neoplasia that may occur in different parts of the urinary system. Occupational and environmental exposures to chemicals are important risk factors related to this disease. High dietary concentrations of sodium saccharin (NaS), an organic non-caloric sweetener, or of diuron, a substituted urea herbicide, induce urinary bladder carcinoma in rats exposed for extended periods of time. Our group has shown induction of proliferative changes in the urinary bladder urothelium of rats exposed to these compounds for seven days, or 15 and 20 weeks. However, proliferative changes induced by these compounds in the kidney pelvis urothelium have not been systematically described. **Objective:** To evaluate urothelial morphology and the cell proliferation rate in the kidney pelvis of male Wistar rats fed 710ppm NaS or diuron 2500ppm for short or relatively long-term exposures. **Material and Methods:** Tissues analyzed in this study were obtained from a previous experiment (Fava et al., 2015) in which forty-two male Wistar rats were allocated to three groups of 14 animals each that were fed control diet or diet with NaS 710ppm or diuron 2500ppm. After seven days or 15 weeks the animals were euthanized; the kidneys were processed for histological and immunohistochemical analyses, the PCNA labeling index (LI) was used for cell proliferation assessment. **Results:** Although not significantly, diuron or NaS both increased the incidences of simple hyperplasia (HS) and the LI when compared to the control. In the

diuron group, the 15-week LI was less than the 07-day LI, despite the occurrence of hyperplastic reaction, suggesting an adaptive process after prolonged exposure. **Conclusion:** Increased cell proliferation in NaS-fed or in diuron-fed animals has been related to abrasion or to cytotoxicity, respectively. The present study indicates that the urothelium of the kidney pelvis is as susceptible as the urinary bladder to chemical agents that induce cell proliferation through different modes of action.

Financial support / Acknowledgments: CNPq - PIBIC- 129475/2015-7, TOXICAM.

EX 56 - DIURON CARCINOGENICITY STUDY: MORPHOLOGICAL CHANGES INDUCED IN THE UROTHELIUM OF RATS

FAVA, R. M. 1; SALES, B. C. P. 1; NASCIMENTO E PONTES, M. G. 1; BENEDITO, O. L. 1; SOUZA, N. P. 1; SANTOS, I. P. 1; VACCARI, C. 1; IHLASEH, S. M. 2; DE CAMARGO, J. L. V. 1; DE OLIVEIRA, M. L. C. S. 1.

1 Núcleo de Avaliação do Impacto do Meio Ambiente Sobre a Saúde Humana (TOXICAM), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB- UNESP, São Paulo -SP, Brasil; 2 BASF, São Paulo - SP, Brasil.

Introduction: The herbicide diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) induced urothelial tumors in the urinary bladder of Wistar rats fed the dietary concentration of 2500ppm in a long-term study. The diuron mode of action involves metabolic activation, cytotoxicity, cell degeneration, necrosis, exfoliation, regenerative cell proliferation and eventually, tumors. Although the role of high dietary concentrations (1250ppm, 2500ppm) of diuron in inducing urothelial lesions is well established, successive studies from our laboratory suggest that the lower concentration of 500ppm may also be cytotoxic and potentially carcinogenic to the rat urothelium. Evidence of urothelial cytotoxicity for this concentration level may directly impact the risk assessment of this substance, since it is five folds lower than that described in the literature as carcinogenic (2500ppm) and very close to the currently accepted NOAEL of 125ppm. **Objective:** To verify if long-term dietary 500ppm diuron induces urothelial lesions. **Material and Methods:** One hundred and thirty two male Wistar rats were allocated to non-exposed control or to 500ppm diuron-fed groups and evaluated after 20 or 84 weeks. Urinary bladders and kidneys were processed for histological analyses. **Results:** Diuron-fed animals had survival rates similar to the controls, i.e., 66.6% and 69.6%, respectively.

Premiação: 3º melhor trabalho apresentado na forma de pôster – CEATOX

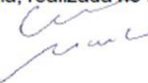
XVI Jornada Científica de Toxicologia Agrotóxicos: Ambiente e Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho ESTUDO DE CARCINOGENICIDADE DO DIURON: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDA NO UROTÉLIO DE RATOS do(s) autor(es) FAVA, RAFAELA MARONO (FMB); SALES, BIANCA CAMARGO PENTEADO (FMB); E PONTES, MERIELEN GARCIA NASCIMENTO (OUTRAS); BENEDITO, OSVALDO LUIS (FMB); SOUZA, NATHÁLIA PEREIRA (FMB); SANTOS, ISABELA POSCIDONIO (FMB); VACCARI, CAROLINA (FMB); IHLASEH-CATALANO, SHADIA MUHAMMAD (OUTRAS); DE CAMARGO, JOÃO LAURO VIANA (OUTRAS); DE OLIVEIRA, MARIA LUIZA COTRIM SARTOR (OUTRAS) foi premiado com o 3º lugar, durante a XVI Jornada Científica

de Toxicologia, realizada no Espaço IBB de Eventos da UNESP, na categoria Pôster.

Botucatu, 23 de agosto de 2017.



Prof. Dr. Cesar Martins
Diretor do Instituto de Biociências



Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim
Supervisora do CEATOX

