

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE BOTUCATU

**“ESTUDO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES DOSES DO DIURON
(3-(3,4-DICHLOROPHENYL)-1,1-DIMETHYLUREA) NO EPITÉLIO DA BEXIGA DE
RATOS WISTAR MACHOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA”**

ANA PAULA FERRAGUT CARDOSO

Acadêmica

Profa. Dra. MARIA LUIZA COTRIM SARTOR DE OLIVEIRA

Orientador

Prof. Dr. JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO

Co-Orientador

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências - UNESP Botucatu, SP -
como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas
Modalidade Médica.

Botucatu – SP

2008

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita”.

(Mahatma Gandhi)

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho com carinho:

Aos meus pais Roberto e Maria pelo amor incondicional, pelos valores ensinados, pelo apoio que me deram e principalmente por terem acreditado em mim.

“Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse

Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz

Vocês perderam noites de sono para que eu dormisse tranquila

Acreditaram em mim, apesar dos meus erros.” (Augusto Cury)

Ao meu irmão Danilo, por termos construído uma bela relação de companheirismo, cumplicidade, amor e confiança.

“Jamais esqueça que eu levarei para sempre um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser.” (Augusto Cury)

Aos meus avós Sebastião e Lúcia pelo zelo e carinho com que sempre me trataram, pelo exemplo de amor, respeito e fé. Agradeço pelas bênçãos e orações que confiaram á mim todos os dias.

“Não há verdadeira felicidade sem sabedoria, e esta pode ser encontrada em todos os estágios da vida.” (Rousseau)

Aos meus avós José e Lídia (*in memoriam*), que certamente me guiaram durante esse caminho.

“A casa da saudade chama-se memória: é uma cabana pequenina a um canto do coração.” (Henrique Maximiliano Coelho Neto)

Aos meus tios, tias, primos e primas, pelo carinho, pela torcida, pelo incentivo, pelos momentos de alegria e descontração que me proporcionam.

“Vivemos em nossas ações, não em anos; em pensamentos, não em respirações; em sentimentos, não nos números do mostrador do relógio.” (Philip James Bailey)

Às minhas amigas irmãs Buzuza, Pingüim, Perdiz e Dori, por fazerem minha vida aqui tão mais especial e divertida! Por compartilharmos momentos bons e ruins que me fizeram sorrir, chorar, aprender e amadurecer. Espero levar pra vida toda a amizade de cada uma de vocês.

“A vida é em parte o que nós fazemos dela, e em parte o que é feito pelos amigos que nós escolhemos.” (Tennessee Williams)

Às minhas outras irmãs de Vinhedo Mari, Ná, Ná, Bru e Gabi, amigas super especiais e maravilhosas com as quais dividi, e divido grande parte da minha vida. Apesar da distância é possível senti-las perto!

“Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.” (William Shakespeare)

À Deus por ser tão generoso comigo, permitindo que pessoas maravilhosas cruzassem meu caminho, por me dar oportunidades, força e sabedoria

“Minhas imperfeições e fracassos são como uma bênção de Deus, assim como meus sucessos e meus talentos, e eu coloco ambos a seus pés.” (Mahatma Gandhi)

À XLI turma de biomedicina, pelas risadas, amizades, festas, churrascos, brigas e discussões que tornaram esses 4 anos inesquecíveis!

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira por me orientar na realização deste trabalho com muita paciência e profissionalismo. Obrigada pelo conhecimento compartilhado e por aquele que me ensinou a buscar.

Ao Prof Dr. João Lauro Viana de Camargo, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à pesquisa

“Eu aprendi que para crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu.” (William Shakespeare)

À todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, compartilhando seus valiosos conhecimentos.

Aos colegas do laboratório TOXICAM, pelos ensinamentos e pelo auxílio na realização do projeto.

À FAPESP pelo auxílio financeiro fornecido e por sempre incentivar a pesquisa.

A todas as pessoas que sempre torceram por mim e me apoiaram, tornando possível a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Estudo da toxicidade de diferentes doses do Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) no epitélio da bexiga de ratos Wistar machos por microscopia eletrônica de varredura”

SUMÁRIO

1	RESUMO	12
2	ABSTRACT	14
3	INTRODUÇÃO	16
3.1	Carcinogênese da bexiga urinária.....	16
3.2	Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, CAS 330-54-1)	16
4	OBJETIVOS.....	20
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1	Animais e ambiente de experimentação	22
5.2	Substância química	22
5.3	Rações	22
5.4	Delineamento experimental.....	22
5.5	Eutanásia dos animais, necropsia e processamento do material.....	23
5.6	Processamento das bexigas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) 24	
5.7	Critério de análise diagnóstico para bexigas urinárias por MEV	24
5.8	Análise estatística	25
6	RESULTADOS	27
7	CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	31
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.

TABELA 1: Incidência das alterações da mucosa da bexiga urinária por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
TABELA 2 – Comparação do diagnóstico obtido pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o histológico, independente da dose administrada.....	29
TABELA 3 – Avaliação do diagnóstico histológico considerando o diagnóstico por MEV como padrão ouro.	29
TABELA 4 – Efeitos do Diuron no urotélio de ratos Wistar machos após tratamento de 20 semanas.	32
FIGURA 1: Protocolo experimental	23
FIGURA 2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (A) classe 1, controle (1600x, bar = 100µm); (B) classe 2, 500ppm Diuron (600x, bar = 200µm); (C) classe 3, 500ppm Diuron (600x, bar = 200µm); (D) classe 4, 125ppm Diuron (1200x, bar = 100µm), (E) classe 5, 125ppm Diuron (1300x, bar = 100µm); (F) classe 5, 2500ppm Diuron (300x, bar = 500µm).	28
FIGURA 3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV): cristais isolados e cristais compactados.	29

RESUMO

1 RESUMO

O Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) é um herbicida derivado da uréia, muito utilizado no Brasil para controlar plantas daninhas nas culturas de soja, algodão e cana de açúcar, entre outras. Evidências experimentais indicam que o Diuron é cancerígeno para roedores; induz tumores na pele e mama de camundongos, e na bexiga e pelve renal de ratos, quando administrado pela ração em concentrações elevadas. O Diuron foi classificado pela agência ambiental norte-americana (EPA) como “provável cancerígeno para a espécie humana”.

Em um estudo prévio desenvolvido por nosso grupo, ratos Wistar machos tratados com Diuron 2500 ppm durante 20 semanas apresentaram aumento dos índices de proliferação celular e da incidência de hiperplasia urotelial simples (HS) na bexiga. À microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram observados focos de necrose grave e hiperplasia do urotélio vesical dos animais expostos ao herbicida. Porém, nesse estudo não foram avaliados possíveis alterações uroteliais nas bexigas de animais expostos a concentrações menores de Diuron, de modo que não se sabe se há efeito dose-resposta do Diuron sobre o urotélio.

O objetivo deste trabalho foi estudar por MEV a ação do Diuron sobre o epitélio da bexiga de ratos Wistar machos expostos as doses de 125, 500 e 2500 ppm durante 20 semanas e verificar a existência de eventual dose-resposta nos fenômenos de citotoxicidade e regeneração celular e ainda, comparar os achados da MEV com os histológicos verificados previamente nas mesma bexigas. Os grupos 125ppm e 2500ppm de Diuron apresentaram incidências significativamente maiores ($p < 0,05$) de lesões na mucosa, i.e, 7/10 e 8/10 respectivamente, comparados ao grupo controle e ao grupo 500ppm.

Ao compararmos as lesões verificadas pela MEV com as lesões histológicas, observamos que a MEV foi mais sensível: detectou uma incidência de 45% de hiperplasias, enquanto a abordagem histológica detectou 27%. Considerando o diagnóstico pela MEV como padrão-ouro, a histologia mostrou sensibilidade de 44,4%, especificidade 86,4%, valor preditivo positivo (VPP) de 72,7%, valor preditivo negativo (VPN) de 65,5% e acurácia de 67,5%.

A Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou ser um método mais sensível, confiável e conveniente para identificar, localizar e classificar mais alterações citotóxicas e proliferativas das bexigas. Os achados da MEV mostraram que o herbicida Diuron induziu lesões nas concentrações de 125ppm e 2500ppm, mas não na de 500 ppm. Desta forma, não foi possível concluir sobre a existência de efeito dose-resposta deste herbicida sobre o urotélio.

ABSTRACT

2 ABSTRACT

Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) is a substituted urea herbicide widely used on agricultural crops such as soy, cotton and sugar cane. In a previous long-term study this herbicide exerted carcinogenic activity on the urinary bladder and renal pelvis mucosa of Wistar rats and breast of mice. Also, it was shown to be carcinogenic to the mice skin in a initiation-promotion assay. In 1997, the north-american EPA evaluated Diuron as a “known/likely” carcinogen for humans (USEPA, 2004).

In a previous study developed at this laboratory, male Wistar rats treated with Diuron 2500 ppm during 20 weeks presented increased indices of cell proliferation and incidences of simple urothelial hyperplasia (HS) in the urinary bladder. Under scanning electron microscopy (SEM) severe urothelial necrosis and hyperplasia were observed. However, in that study the urinary bladders of animals exposed to lower doses of Diuron were not examined under SEM. Therefore, the possible dose-response influence of Diuron on the urothelium under SEM is not known.

The present study aimed to analyze under SEM the urinary bladder of male Wistar rats exposed to 125 ppm, 500 ppm and 2500 ppm doses of Diuron through diet during 20 weeks and to compare to the previous histological findings in the same material. Under SEM, 125 ppm and 2500 ppm groups presented significantly ($p<0,05$) increased incidences of simple hyperplasia, i.e., 7/10 and 8/10 respectively, compared to control group and the 500 ppm group

The sensitivity of SEM was higher since it detected a 45% incidence of hyperplasias while the histological analysis found only 27%. Considering SEM as the gold-standard, histology showed a 44% sensitivity, 86.4% specificity, a positive predictive value of 72,7% and negative predictive value of 65,5% and accuracy of 67,5%.

Scanning Electron Microscopy was more sensitive, reliable and convenient method for identifying, tracking and classifying cytotoxic and proliferative changes in the urothelium, not detectable under light microscopy. SEM findings showed that Diuron induced lesions in the 125 ppm e 2500 ppm concentration groups and not in the 500 ppm one. It was not possible to conclude about a dose-reponse effect.

INTRODUÇÃO

3 INTRODUÇÃO

3.1 Carcinogênese da bexiga urinária

Ocorrem aproximadamente 330 mil novos casos de câncer de bexiga por ano no mundo (Brauers & Jakse, 2000; Sanderson et al., 2007), mais freqüentemente em homens que em mulheres, na razão de 3:1. A incidência dos tumores vesicais aumenta com a idade e é mais comum em brancos do que em negros (Sanderson et al., 2007; Scélo e Brennan, 2007) e os países com as taxas de incidência mais elevadas são Egito, Espanha, Holanda, Itália e os menores índices foram encontrados na África, Ásia e América Central (Scélo e Brennan, 2007). Mais de 90% das neoplasias de bexiga são carcinomas de células transicionais; ocorrem ainda 6% de carcinomas epidermóides e, menos freqüentemente, adenocarcinomas e tumores de origem não epitelial (Rischmann, 2000). No ser humano, a indução e o desenvolvimento do câncer da bexiga estão associados ao fumo, à exposição ocupacional à alfa e beta-naftilamina por trabalhadores da indústria têxtil, ao 4-aminobifenil usado na fabricação de corantes e a solventes orgânicos como a benzidina, utilizada na confecção da borracha e pneus (Negri & La Vecchia, 2001; Scélo e Brennan, 2007). Outros prováveis fatores de risco são: a exposição ambiental crônica a contaminantes da água, como tri-halometanos e arsênico, a radiação, infecção crônica do trato urinário causada por *Schistosoma haematobium*, dietas ricas em gordura, alteração do pH urinário, além de alguns fatores hereditários.

3.2 Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, CAS 330-54-1)

O Diuron é um herbicida derivado da uréia, amplamente utilizado no Brasil para o controle de plantas daninhas nas culturas de soja, algodão e cana de açúcar, entre outras.

Evidências experimentais indicam que o Diuron é cancerígeno para roedores. Em estudo de duas etapas (iniciação-promoção) o herbicida provocou aumento da incidência de papilomas na pele de camundongos (Antony et al., 1989). Em 2002, a United States Environmental Protection Agency publicou um memorando informando que o Diuron é cancerígeno para a bexiga de ratos Wistar e mama de camundongos NMRI (USEPA, 2002); por serem de propriedade empresarial, a comunidade científica e o público em geral não têm acesso aos resultados brutos deste estudo.

Particularmente, o memorandum da USEPA referiu que ratos Wistar de ambos os sexos apresentaram aumento significativo da incidência de papilomas e carcinomas uroteliais na bexiga após dois anos de exposição contínua ao Diuron, administrado pela ração na concentração de 2500 ppm; foram também observados papilomas e carcinomas uroteliais na pelve renal. Devido estas observações, o Diuron foi classificado pela USEPA como “provável cancerígeno para a espécie humana” (USEPA, 2004).

Em um estudo prévio desenvolvido por nosso grupo, ratos Wistar machos tratados com Diuron 2500 ppm durante 20 semanas apresentaram aumento dos índices de proliferação celular e da incidência de hiperplasia urotelial simples (HS) na bexiga (Nascimento et al., 2006). À microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram observados focos de necrose grave e hiperplasia do urotélio vesical dos animais expostos ao herbicida. A análise do sedimento urinário pela MEV mostrou numerosos cristais de fosfato de amônio e magnésio, e precipitados amorfos. Estes precipitados amorfos, compostos principalmente por fosfato de cálcio e pequena quantidade de potássio, cloro, enxofre e sílica, podem atuar como micro-abrasivos para o urotélio, provocando morte celular e conseqüente hiperplasia regenerativa (Cohen et al, 1990; 1991b; 1993; de Oliveira, 1998). Deste modo, é possível que os componentes do sedimento urinário de animais tratados com Diuron exerçam efeito lesivo sobre o urotélio, sendo os indutores da hiperplasia urotelial observada que, neste caso, teria caráter regenerativo. Esses achados, verificados em animais expostos à doses elevadas do Diuron podem dar substrato a um possível modo de ação (MOA) cancerígeno do Diuron já que, em alguns caso, a carcinogênese da mucosa urinária do rato parece estar relacionada à formação de precipitados amorfos e ou a micro-cristais na urina, o que é influenciado pelo tipo de ração, pela concentração de sais na urina e pelos níveis do pH urinário (Cohen et al, 1991a, b; 1993). Deve ser indicado que nesse estudo prévio não avaliamos possíveis alterações uroteliais nas bexigas de animais expostos à concentrações menores de Diuron, de modo não sabemos se estas alterações são dependentes de doses, isto é, se há efeito dose-resposta com relação ao efeito tóxico do Diuron sobre o urotélio.

Os precipitados amorfos, a necrose focal e a conseqüente hiperplasia regenerativa podem ser caracteristicamente visualizados pela MEV (Cohen et al., 1991b, 1993, 1995, de Oliveira, 1998). A MEV é um método muito conveniente para a

identificação, localização e classificação das alterações citotóxicas e proliferativas da bexiga, já que sinais discretos de citotoxicidade e de necrose da camada de células superficiais frequentemente não são detectados pela microscopia óptica. Por isso, a MEV é uma maneira confiável de avaliar a superfície do urotélio, além de permitir a análise de uma área mais ampla, se comparada com a microscopia óptica.

Há poucos relatos na literatura de acesso público sobre o efeito cancerígeno do Diuron na bexiga de ratos, e pouco se conhece a respeito dos mecanismos potenciais de carcinogenicidade deste produto sobre o urotélio. A citotoxicidade pode preceder os picos de proliferação celular e sua ocorrência pode ser avaliada morfologicamente pela microscopia eletrônica de varredura.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Com a finalidade de estudar a ação do Diuron sobre o epitélio da bexiga de ratos Wistar machos e a eventual existência de dose-resposta nos fenômenos de citotoxicidade e regeneração celular induzida pelo herbicida, pretende-se analisar, por Microscopia Eletrônica de Varredura, o urotélio de ratos machos. As alterações registradas pela MEV serão comparadas às visualizadas à microscopia óptica na mesma bexiga.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e ambiente de experimentação

O protocolo experimental do presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo nº 167/2004). O experimento foi desenvolvido (Figura 1) e os efeitos da concentração mais elevada, de 2500ppm, já foram adequadamente divulgados (Nascimento et al., 2006). No entanto, ainda não exploramos a possível relação dose-resposta das lesões de interesse, seja pela microscopia óptica como pela microscopia eletrônica. Portanto, pretende-se avaliar o urotélio vesical de todos os 40 ratos da linhagem Wistar sacrificados na 26ª semana de idade. Os animais foram fornecidos pelo CEMIB da Unicamp, Campinas, SP, Brasil, e alojados em gaiolas plásticas com forração de maravalha de pinho, cinco animais por gaiola, em sala com temperatura de 21 ± 3 °C, umidade relativa de $50 \pm 20\%$ e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Inicialmente, passaram por período de aclimação às condições do biotério por duas semanas.

5.2 Substância química

Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, CAS 330-54-1) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, Catálogo No. D2425).

5.3 Rações

A substância química foi misturada na ração pulverizada Nuvilab (Maringá, PR). A mistura foi posteriormente peletizada. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

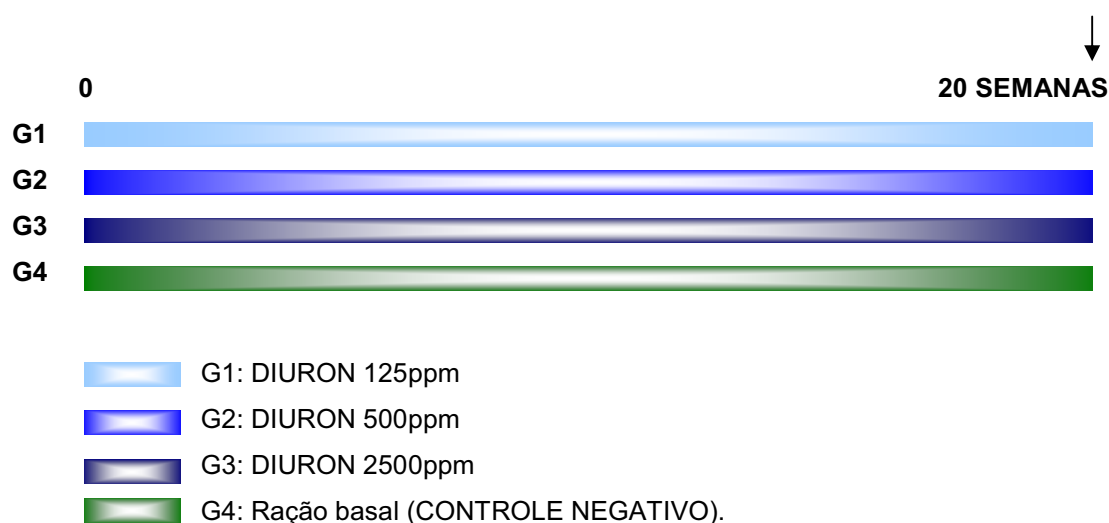
5.4 Delineamento experimental

No dia zero do experimento, os animais foram randomizados em 04 grupos de 10 animais cada, e identificados individualmente com ácido pícrico na pelagem. No mesmo dia, foi iniciado o fornecimento das rações adicionadas com as diferentes concentrações do herbicida (Figura 1): grupo 1 (G1) – Diuron 125ppm; grupo 2 (G2) – Diuron 500ppm; grupo 3 (G3) – Diuron 2500ppm e grupo 4(G4) – ração basal. Os consumos médios individuais e diários de água e dieta foram registrados para cada grupo em intervalos de 2 dias, nas semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 do experimento. Os ratos foram pesados nas semanas 0, 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20.

Na 4^a, 9^a, 13^a e 19^a semanas foram realizados exames clínicos detalhados nos animais. As rações experimentais foram administradas durante 20 semanas, após o que, os ratos foram sacrificados.

5.5 Eutanásia dos animais, necropsia e processamento do material

Os animais foram sacrificados no final da 20^a semana do experimento, por overdose (aproximadamente 50 mg/kg de peso corpóreo, i.p.) de solução de pentobarbital sódico. No momento da necropsia, as bexigas foram infladas por injeção intraluminal com fixador de Bouin, removidos imediatamente e imersas no mesmo fixador. Quatro horas após a fixação, as bexigas foram seccionadas ao meio, lavadas três vezes com álcool 70% e examinadas macroscopicamente. Uma metade das bexigas permaneceu estocada em álcool 70% e será utilizada para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), cujo processamento e análise estão descritos nos itens 6 e 7.



CONSUMO RAÇÃO E ÁGUA: SEMANAS ÍMPARES (01, 03, 05, 07, 09, 11, 13, 15, 17, 19)

PESO CORPÓREO: SEMANAS PARES EXCETO SEMANA 4 (0, 02, 06, 08, 10, 12, 14, 16, 18, 20)

AValiação CLÍNICA: SEMANAS 04, 09, 13, 19

↓ **SACRIFÍCIO: 20^a SEMANA**

FIGURA 1: Protocolo experimental

5.6 Processamento das bexigas para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

1. Bexigas fixadas em Bouin no momento da eutanásia.
2. Após 4 horas de fixação, lavagem 3 vezes em álcool 70%,
3. Lavagem em água destilada (3 vezes de 10 min. cada),
4. Pós-fixação em tetróxido de ósmio 0,5% em água destilada por 30 min
5. Passagens por gradientes de álcool etílico a 7,5%, 15%, 30%, 50% (duas passagens de 10 min cada), álcool etílico a 70% (três passagens de 15 min), álcool etílico a 90% (duas passagens de 15 min) e álcool etílico a 100% (duas passagens de 10 min cada),
6. As bexigas serão imersas em dióxido de carbono líquido e colocadas no aparelho Balzers CPD-020 (Bal-tec, Wiesbaden, Germany), para obtenção do ponto crítico de secagem,
7. Após secagem, as bexigas serão aderidas utilizando esmalte de unha e condutor de prata, a um pequeno suporte de alumínio ("stubs") e transferidas para o aparelho Metalizador BAL-TEC SCD 050, para cobertura da superfície das bexigas por uma camada de ouro,
8. As bexigas serão analisadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Quanta 200 FEI marca Phillips (Netherlands) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Unesp – Botucatu.

5.7 Critério de análise diagnóstico para bexigas urinárias por MEV

As alterações do urotélio vesical serão classificadas em classes de 1 a 5 por análise semi-quantitativa (Cohen et al.,2007):

- **Classe 1:** Urotélio normal, composto por células poligonais amplas. A ocorrência rara de algumas células necróticas ou esfoliadas são consideradas como devido á morte natural delas;
- **Classe 2:** Urotélio com células poligonais amplas, com pequenas áreas com células necróticas e descamação (esfoliação mínima);
- **Classe 3:** Urotélio mostrando pleomorfismo das células poligonais, com áreas numerosas e pequenas com células necróticas e descamadas, podendo estar presente ainda espessamento ou enrugamento das células;

-
- **Classe 4:** Extensiva área de necrose e descamação principalmente na cúpula da bexiga e de permeio as células poligonais maduras, observam-se ainda outras pequenas, redondas, características de células mais profundas do urotélio;
 - **Classe 5:** Áreas de necrose e descamação comprometendo quase toda o urotélio, com superposição de pequenas células redondas com microvilos uniformes, às vezes pleomórficos. Novamente, a cúpula da bexiga é a mais comprometida.

5.8 Análise estatística

Os dados obtidos serão comparados pelo teste de análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças entre os grupos estudados. Se houver diferença, será realizado o teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ serão considerados como indicando diferenças significativas.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

A análise das 40 bexigas à MEV mostrou desde urotélios normais até urotélios com células arredondadas e extensa área de necrose e descamação (Figura 2). Conforme pode ser visto na Tabela 1, os grupos 125ppm e 2500ppm de Diuron apresentaram maiores incidências de lesões na mucosa 7/10 e 8/10 respectivamente, sendo estatisticamente diferentes ($p<0,05$) do grupo controle. O grupo 500ppm apresentou incidência 2/10. Analisando as diferenças entre as doses administradas, o grupo 500ppm mostrou-se diferente estatisticamente ($p<0,05$) do grupo 2500ppm e do grupo 125ppm, a diferença foi de $p<0,069$.

TABELA 1: Incidência das alterações da mucosa da bexiga urinária por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Grupos/tratamentos	Classes de alterações da mucosa ¹		
	N	1 - 3	4 - 5
G1: 125 ppm Diuron	10	3 (30%) ^{ab}	7 (70%) ^{ab}
G2: 500 ppm Diuron	10	8 (80%) ^{bcd}	2 (20%) ^{bcd}
G3: 2500 ppm Diuron	10	2 (20%) ^a	8 (80%) ^a
G4: controle	10	9 (90%) ^c	1 (10%) ^c

¹ Classes 1-5: aumento na severidade das alterações na mucosa (Cohen et al., 2007).

N: número efetivo de animais

^{a,b} Significativamente diferente do grupo controle $p<0,05$

^c Significativamente diferente do grupo 2500ppm $p<0,05$

^d Significativamente diferente do grupo 125 ppm $p<0,069$

Ao compararmos a classificação das lesões obtidas pela microscopia eletrônica de varredura com a classificação histológica, observamos que pela MEV 22/40 bexigas foram consideradas normais e 18/40 com hiperplasia, já o diagnóstico histológico mostrou 29/40 bexigas normais e 11/40 hiperplásicas (Tabela2). Considerando o diagnóstico pela MEV como padrão ouro, a histologia mostrou sensibilidade de 44,44%, especificidade 86,36%, valor preditivo positivo (VPP) de 72,72%, valor preditivo negativo (VPN) de 65,51% e acurácia de 67,5% (Tabela 3).

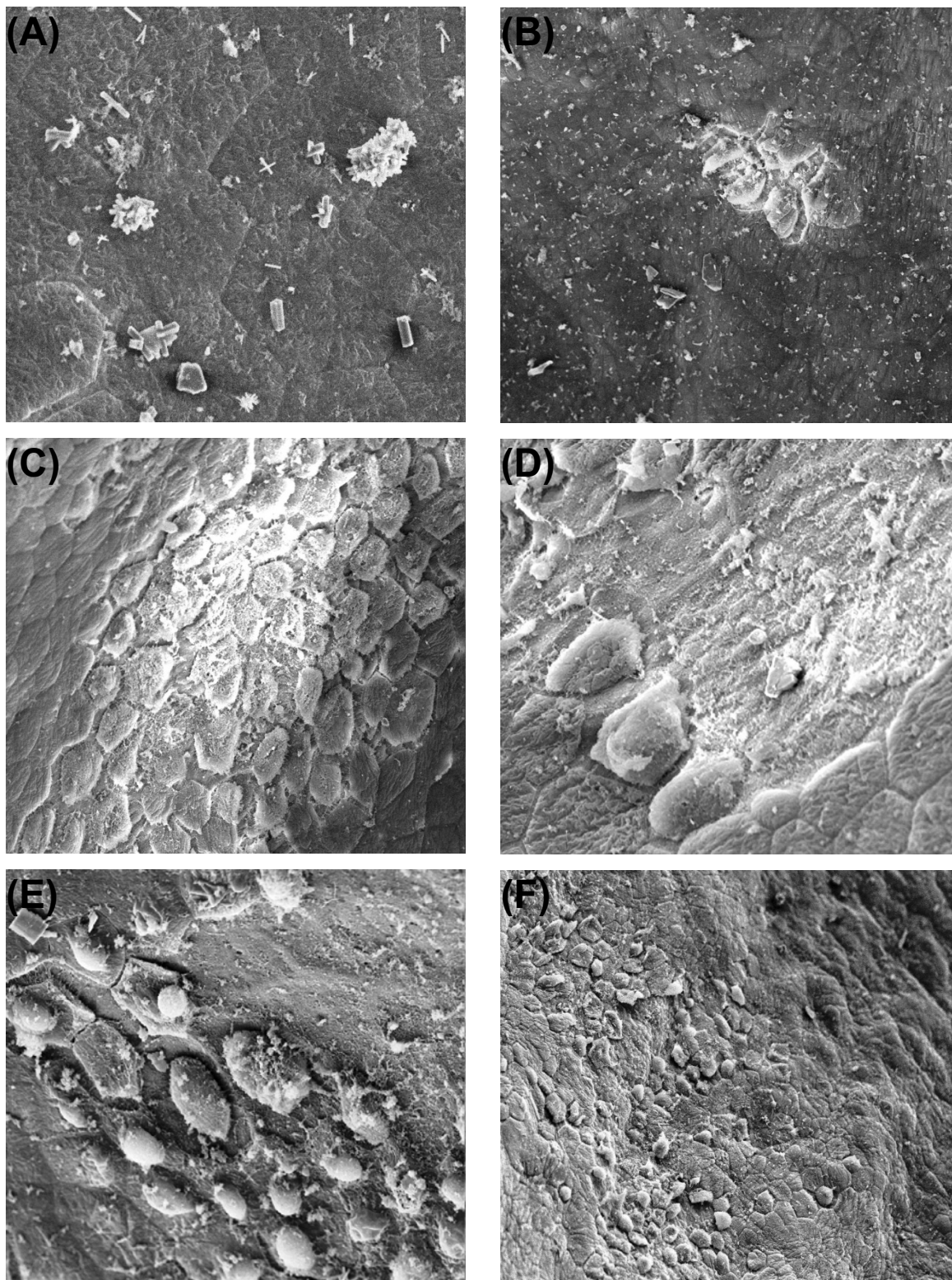


FIGURA 2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (A) classe 1, controle (1600x, bar = 100 μ m); (B) classe 2, 500ppm Diuron (600x, bar = 200 μ m); (C) classe 3, 500ppm Diuron (600x, bar = 200 μ m); (D) classe 4, 125ppm Diuron (1200x, bar = 100 μ m), (E) classe 5, 125ppm Diuron (1300x, bar = 100 μ m); (F) classe 5, 2500ppm Diuron (300x, bar = 500 μ m).

TABELA 2 – Comparação do diagnóstico obtido pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o histológico, independente da dose administrada.

Bexigas	Diagnóstico Histológico		Diagnóstico por MEV	
	N	HS	N	HS
40	29	11	22	18

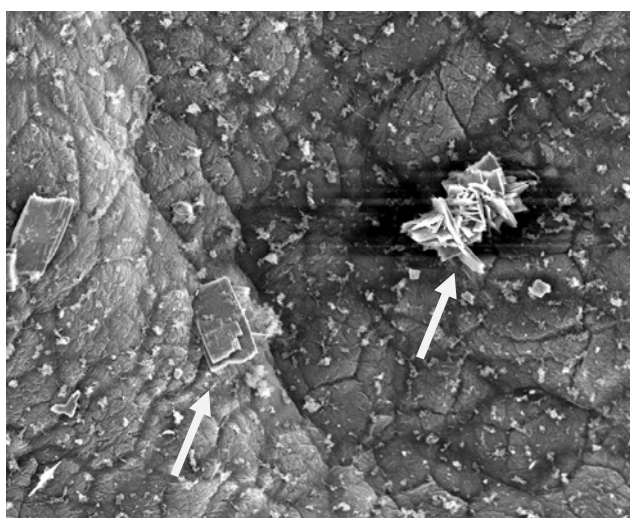
N: Normal; HS: Hiperplasia Simples

TABELA 3 – Avaliação do diagnóstico histológico considerando o diagnóstico por MEV como padrão ouro.

Diagnóstico Histológico	Sensibilidade	Especificidade	VPP ^a	VPN ^b	Acurácia
	44,44%	86,36%	72,72%	65,51%	67,5%

^aVPP: Valor Preditivo Positivo; ^bVPN: Valor Preditivo Negativo

Foram visualizados ainda, ao microscópio eletrônico de varredura, tanto nos grupos tratados com Diuron independente da dose administrada, quanto no grupo controle, a presença de cristais isolados e alguns compactados aderidos na superfície do urotélio (Figura 3).

**FIGURA 3:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV): cristais isolados e cristais compactados.

CONCLUSÕES E DISCUSSÃO

7 CONCLUSÕES E DISCUSSÃO

No presente estudo, a Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou ser um método mais sensível, confiável e conveniente para identificar, localizar e classificar as alterações citotóxicas e proliferativas das bexigas, considerando que apenas 11 bexigas foram classificadas como hiperplásicas pelo diagnóstico histológico, contra 18 (classes 4 e 5) consideradas hiperplásicas pela MEV. Desse modo, o método histológico apresenta sensibilidade mais baixa e boa especificidade quando comparado à MEV, uma vez que a MEV diagnosticou mais alterações que a histologia.

O resultado encontrado na MEV nas quais as doses de 125ppm e 2500ppm provocaram alterações mais graves do que a dose de 500ppm, gerou em nós questionamento com relação ao efeito dose-resposta. Não houve aumento linear nas alterações do urotélio vesical com o aumento da dose do herbicida.

A dose de 125ppm é considerada segura pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da America (USEPA), baseando-se em dados histológicos por não produzir alterações significativas no urotélio vesical. No presente estudo, a dose de 125 ppm também não mostrou alterações significativas no urotélio à microscopia óptica (Nascimento et al., 2006), mas provocou alterações citotóxicas e regenerativas registradas pela MEV. Estes dados podem gerar mudanças drásticas na legislação daquele país quanto à segurança do uso deste herbicida.

Os resultados encontrados na MEV, método mais sensível do que a histologia, vem suscitar dúvidas com relação ao efeito dose-resposta e quanto a possíveis problemas de execução do experimento. Cohen et al. 2007 tem ressaltado que a bexiga deve ser removida enquanto o animal está vivo e sob anestesia profunda. Se a mesma não for retirada rapidamente mudanças degenerativas no urotélio podem advir de autólise, as quais podem ser indistinguíveis da necrose relacionada ao tratamento.

No estudo de proliferação celular destes animais, utilizando o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) como marcador imunohistoquímico de proliferação celular, verificou-se que, embora estatisticamente não diferente do grupo controle, a dose de 125ppm mostrou índices maiores ($0,44 \pm 0,84$) do que a dose de 500ppm ($0,21 \pm 0,26$), sugerindo que os achados da MEV podem ser consistentes (dados de proliferação já publicados por Nascimento et al 2006 - Tabela 4).

TABELA 4 – Efeitos do Diuron no urotélio de ratos Wistar machos após tratamento de 20 semanas.

Grupos/Tratamento	Bexigas ^a			Proliferação celular na bexiga (cell/cm) ^a [valor $\pm$ DP] ^e	Classificação das alterações da mucosa ^b por MEV ^c				
	Normal	HS	HPN		1	2	3	4	5
G1: 125 ppm Diuron	8	2	0	0.44 $\pm$ 0.84	-	-	-	-	-
G2: 500 ppm Diuron	8	2	0	0.21 $\pm$ 0.26	-	-	-	-	-
G3: 2500 ppm Diuron	3	7**	0	0.87 $\pm$ 1.10*	1	-	1	-	3 ^d
G4: 8.3% SNa ^f	5	3	2*	2.73 $\pm$ 5.29*	-	1	-	-	1
G5: Controle	10	0	0	0.27 $\pm$ 0.63	1	1	1	-	-

Nascimento et al. 2006

^aNúmero de animais: 10/grupo; HS: Hiperplasia Simples; HPN: Hiperplasia Papilífera Nodular; ^bClasses 1 a 5: aumento na severidade das alterações da mucosas; ^cMEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

^dNúmero de animais/ grupo = 5/G3, 2/G4 e 3/G5; ^eDP: Desvio Padrão; ^fSNa: Sacarina Sódica – controle positivo; *Diferença significativa do controle (*p<0,05; **p<0,005).

Diante do exposto, desse resultado não esperado e das questões levantadas por nosso grupo, quanto ao efeito dose-resposta e possíveis problemas de execução, um novo experimento está sendo executado utilizando-se das doses do atual estudo, de doses menores e de intermediárias à maior dose, a fim de confirmar e validar o efeito do Diuron no epitélio da bexiga. Este novo experimento será objeto de tese de mestrado. Assim, seria prematura a publicação destes dados antes da repetição do estudo.

A presença de cristais é um achado normal no sedimento urinário de ratos (Cohen et al, 2007). Assim, não se pode atribuir a eles danos no urotélio, pois estes apareceram de forma ocasional em todos os grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal RC, Kumar S, Mehrota NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Toxicol Lett.* 1996; 89: 1-4.

Agrawal RC, Mehrota NK. Effect of Diuron on germ cells of mice. *Indian J Esp Biol.* 1997; 35: 1256-7.

Antony M, Shukla Y, Mehrota NK. Tumor activity of an herbicide Diuron on mouse skin. *Cancer Lett.* 1989; 30: 125-8.

Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Et Al. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci of altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 1989; 17: 617-28.

Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic lesions as indicators of carcinogenic response. *IARC Sci. Publ.*, 1992; 389-427.

Brauers A, Jakse G. Epidemiology and biology of the human urinary bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000; 126: 575-83.

Canna-Michaelidou S, Nicolaou AS. Evaluation of the genotoxicity potential (by mutatox test) of ten pesticides found as water pollutants in cyprus. *Sci. Total Envirom.*, 1996; 193: 27-35.

Cohen SM. Pathology of experimental bladder cancer in rodents. In: Cohen SM, Bryan GT (Eds). *The Pathology Bladder Cancer*. Boca Raton: Crc Press, 1983. p. 1-40.

Cohen SM, Ellwein LB, Okamura T, Masui T, Johansson SL, Smith RA, Wehner JM, Khachab M, Chappel CI, Schoenig GP. Comparative bladder tumor promoting activity of sodium saccharin, sodium ascorbate, related acids, and calcium salts in rats. *Cancer Res.*, 1991a; 51: 1766-77.

Cohen SM, Garland EM, Wehner JM, et al. Relationship between bladder changes produced in males rats by sodium saccharin treatment and formation of an insoluble amorphus material in the urine. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 1993; 34: 174.

Cohen SM, Cano M, Earl RA, Et Al. A proposed role for silicates and protein in the proliferative effects of saccharin on the male rat urothelium. *Carcinogenesis.* 1991; 12: 1551-5.

Cohen SM, Fisher MJ, Sakata Y, et al. Comparative analysis of the proliferative response of the rat urinary bladder to sodium saccharin by light and scanning electron microscopy and autoradiography. *Scanning Electron Micros.* 1990; 4: 135-42.

Cohen SM. Role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology.* 1995; 33(9): 715-30.

Cohen SM, Arnold LL, Uzvolgyi E, Cano M, St John M, Yamamoto S, Lu X, Le XC. Possible role of dimethylarsinous acid in dimethylarsinic acid-induced urothelial toxicity and regeneration in the rat. *Chem Res Toxicol.*, 2002; 15: 1150-57.

Cohen SM, Ohnishi T, Clark NM, He J, Arnold, LL. Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 337-47.

De Oliveira MLS. Efeitos de sais de sódio, potássio e cálcio sobre a composição da urina sobre o epitélio da bexiga de ratos machos F344. Botucatu, 1998. 86p. Tese (Doutorado) – Faculdade De Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Fukushima S, Shibata MA, Shirai T, Tamano S, Ito N. Roles of urinary sodium ion concentration and pH in promotion by ascorbic acid of urinary bladder carcinogenesis in rats. *Cancer Research.* 1986; 46: 1623-26.

Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, eds. *Handbook of Toxicologic Pathology*, 2nd ed Academic Press, San Diego, Ca, 2001.

Hsu, S.-M., Raine, L., Fanger, H.,. Use of avidin–biotin peroxidasecomplex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparisonbetween ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.*J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29: 577–580.

to N, Fukushima S. Promotion of urinary bladder carcinogenesis in experimental animals. *Exp Pathol.* 1989; 36: 1-15.

Larini L. Toxicologia de praguicidas. In: Larini L, Editor. *Herbicidas*. São Paulo: Manole Ltda; 1999. P. 143-148.

Liu J. Phenylurea Herbicides. In: K.E. Krieger (Ed), Handbook of Pesticides Toxicology - Agents, Academic Press, San Diego, 2001; 1521-1523

Nascimento MG, De Oliveira MLCS, Lima AS, De Camargo JLV. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder mucosa of male Wistar rats. Toxicol. 2006; 224: 66-73.

Negri E, La Vecchia C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. Eur J Cancer Prev. 2001; 10: 7-14.

Rischmann P. Current treatment of cancer bladder: from epidemiology to surgical. Anticancer Drugs. 2000; 11: S3-S8.

Roldan-Arjona T, Luque-Romero FL, Ruiz-Rubio M, Pueyo C. Quantitative relationship between mutagenic potency in the ara test of salmonella typhimurium and carcinogenic potency in rodents. A study of 11 direct-acting monofunctional alkylating agents. Carcinogenesis. 1990; 11: 975-80.

Sanderson S, Salanti G, Higgins J. Joint effects of the N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) genes and smoking on bladder carcinogenesis: a literature-based systematic HuGE review and evidence synthesis. Am J Epidemiol. 2007; 166: 741-51.

Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Mut Res 2003; 544: 99-106.

Scélo G, Brennan P. The epidemiology of bladder and kidney cancer. Nat Clin Practice. 2007; 4:205-17.

Seiler JP. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. Mutagenicity test with some urea herbicides. Mutat Res. 1978; 58: 353.

Tarasov VA, Abilev SK, Velibelkov RM, Aslanian MM. Effectiveness of a battery of tests to assess the potential mutagenic danger of chemical compounds. Genetika. 2003; 39: 1406-

USEPA – U. S. Environmental Protection Agency. Chemicals evaluated for carcinogenic potential. Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch. 22p. 2004.

USEPA – U. S. Environmental Protection Agency. Evidence on the developmental and reproductive toxicity of diuron. Reproductive and cancer hazard assessment section. Office of Environmental Health Hazard Assessment. California Environmental Protection Agency – Draft. 43p. 2002.