
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha

**Proliferação e Morte Celular (Apoptose)
avaliadas em ratos Lewis após tratamento
com mistura de praguicidas em baixas doses**

Botucatu

2012

Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha

Proliferação e Morte Celular (Apoptose) avaliadas em ratos Lewis após tratamento com mistura de praguicidas em baixas doses

Orientadora: Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Rocha, Ana Beatriz Missio Vieira da.

Proliferação e Morte Celular (Apoptose) avaliadas em ratos Lewis após tratamento com mistura de praguicidas em baixas doses / Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha. – Botucatu: [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Carla Adriene da Silva Franchi

Capes: 40105008

1. Apoptose – Estudos experimentais. 2. Pesticidas – Resíduos em alimentos. 3. Células hepáticas. 4. Defensivos agrícolas. 5. Células – Proliferação. 6. Carcinogênese. 7. Fígado – Doenças.

Palavras-chave: Apoptose; Baixas doses; Hepatocarcinogênese; Mistura de praguicidas; Proliferação celular; Ratos.

Agradecimentos

À todos os ratos e qualquer outro animal de experimentação que cederam suas vidas em prol da ciência. Sem eles não teríamos construído todo o conhecimento que temos hoje.

À minha orientadora Dra. Carla Adriene da Silva Franchi, agradeço imensamente, pela oportunidade, paciência, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela oportunidade de participar de um ótimo grupo de pesquisa, e por dividir um pouquinho de sua sabedoria e experiência conosco a cada reunião científica.

A todos do grupo de pesquisa TOXICAM pela amizade, paciência, e experiências divididas. Meri, Iza, Vivi, Ana, Gabi, Lígia, Rafa, Nathalia Souza e Nathalia Almeida, Marize, Mitscheli e João.

Ao Marcos Franchi pela imunoistoquímica das lâminas.

Ao Paulo Roberto Cardoso pela ajuda no processamento das lâminas.

À Cristina Aparecida Alquati Dorico, por sempre prontamente nos auxiliar no que fosse preciso.

Ao Departamento de Patologia e a Faculdade de Medicina da UNESP Botucatu pela oportunidade concedida para a execução do presente trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Proc. 2012/07563-8).

Aos meus pais, João e Vera, pelo amor incondicional. Por tudo que abdicaram, investiram e dedicaram para que eu tivesse tudo do melhor possível. Pelas diversas demonstrações de carinho que me dão todos os dias. Pela comidinha sempre deliciosa da mamãe. Pelas piadinhas sempre sem graça do papai. Eu amo vocês demais e senti falta de cada detalhezinho de vocês nesses quatro anos, até mesmo das broncas e das brigas. Por isso essa monografia, esse diploma, é para vocês.

À minha irmã Mariana, Teits para os íntimos, por me aguentar. Sério, como você consegue? Muito obrigada pelas roupas emprestadas! Por me aguentar com as minhas dúvidas bobas, carências, idiotices no Gtalk. Pela compreensão. Pelos conselhos. E só aproveitando o parágrafo, que eu não vou fazer um só para ele. Ao meu cunhado Bruno Doiche. Muito obrigada por fazer minha irmã feliz, pelos conselhos e pelos presentinhos importados.

"Ter um irmão é ter, pra sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração." Tati Bernardi

À minha tia Irma, pelo amor incondicional. Pelas comidinhas congeladas que facilitaram tanto a minha vida. Por rezar por mim. Por se preocupar tanto comigo, com a minha saúde. Por me ajudar em tudo o que pode nessa vida de universitária pobre.

Ao Billy (*in memoriam*), o melhor e mais carinhoso cachorro do mundo. Por ter me acompanhado nas tardes estudando para o vestibular. Por ter tornado esses 14 anos da minha vida mais doce e divertido.

Ao Shoyu, por me atrapalhar/sentar em cima do teclado/acompanhar muitas vezes enquanto estive escrevendo essa monografia.

Às minhas irmãs/mães/amigas/filhas de Botucatu, Kuku, Trident, Lígia e Band. Pelas risadas, pelas broncas, pelas festas, pelos momentos idiotas, pelos momentos gordos, pelos momentos filosóficos, por cuidarem de mim, por rezarem por mim, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas risadas, pelas risadas... a gente nunca para de rir né?

"Estar ao seu lado é sempre motivo de festa. Quando estamos juntos a vida ganha significado diferente. Retiramos o dia comum do calendário e o transformamos em feriado. Extraímos felicidades das coisas mais simples e multiplicamos a graça de cada instante..." Pe. Fábio de Melo

A todos, Muito Obrigada!

Epígrafe

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciência verdadeiras.” **Albert Einstein**

Sumário

1	Resumo	1
2	Abstract.....	3
3	Introdução	5
4	Objetivo	13
5	Materiais e Métodos	15
6	Resultados	22
7	Discussão	28
8	Referências Bibliográficas.....	32
9	Anexos	37

Resumo

O uso de defensivos agrícolas no Brasil tem se intensificado através dos anos, de forma que desde 2009 vem sendo classificado como o maior mercado de agrotóxicos do mundo. A consequência do uso desse grande volume de praguicidas é, naturalmente a contaminação difusa do ambiente com um número crescente de substâncias químicas de diferentes classes, origens e modos de ação. Pouco se sabe sobre a ação de praguicidas na saúde humana em situações de co-exposição. Os possíveis efeitos tóxicos não atingem apenas trabalhadores agrícolas e industriais, mas também a população em geral, que pode estar exposta continuamente a seus resíduos nos alimentos e na água. Ainda que, nesses meios, os praguicidas estejam em baixas doses, deve-se considerar que possíveis efeitos cumulativos ou sinérgicos podem ocorrer quando há exposição concomitante e/ou prolongada a dois ou mais destes agentes, que podem levar a agravos subclínicos de manifestação tardia, às vezes irreversíveis. O objetivo específico do presente trabalho foi verificar o efeito promotor da carcinogênese de uma mistura de praguicidas em baixas doses e analisar os fenômenos de proliferação celular e apoptose em fígado de ratos.

Foram utilizados 50 ratos Lewis machos divididos em 5 grupos, durante 8 semanas, em modelo de hepatocarcinogênese de média duração. Os pesticidas de três classes diferentes (dieldrin, dicofol, endossulfam, diclorvos e permetrina), cujos resíduos foram detectados pela ANVISA, no período de 2001 a 2005 nas culturas de tomate, foram adicionados à ração dos ratos iniciados para hepatocarcinogênese com dietilnitrosamina (DEN- 200mg/kg i.p.). Foram utilizadas duas misturas diferentes, uma nas doses sem efeito toxicológico (MEX1), referentes à NOEL (no- observed-effect level) e outra nas doses LOEL/LEL/LOAEL (Lowest-observed-effect level/ Lowest-effect level/ Lowest-observed-adverse-effect level), visando instalação de efeitos adversos (MEX2), derivadas de estudos crônicos. Todos os animais sofreram hepatectomia parcial na 3ª semana. A distribuição dos grupos experimentais foi a seguinte: controle negativo, DEN, MEX1, DEN + MEX1 e DEN + MEX2 . Os animais foram eutanasiados na 8ª semana, e seus fígados coletados. Cortes histológicos obtidos do fígado dos animais foram imunomarcados com anticorpo monoclonal anti-antígeno Ki-67, para avaliar a proliferação celular, e anticorpo anti-caspase-3 clivada, para avaliar a apoptose, e em seguida as lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

O índice de proliferação celular (IM) foi estimado pela quantificação de núcleos de hepatócitos positivos para Ki-67 em microscópio óptico convencional com a utilização de uma grade milimetrada. Foram analisados 50 campos sob aumento 400x, dessa forma cada

grade correspondeu a $0,25 \text{ mm}^2$. O IM foi determinado dividindo a quantidade de hepatócitos Ki-67 positivos total pela quantidade de campos multiplicada pela área da grade milimetrada. Dessa forma, obteve-se a quantidade de hepatócitos/ mm^2 . A análise estatística para o índice de proliferação celular foi feita com o teste de Tukey e não evidenciou diferença entre o grupo iniciado com DEN ($6,152 \pm 2,608$) e iniciado com DEN + MEX1 (7.100 ± 2.778), mostrando que a mistura de praguicidas em baixas doses não induziu o aumento da proliferação celular hepática. O tratamento com DEN + MEX2 (8.389 ± 3.340) apresentou aumento significativo do índice de proliferação quando comparado ao grupo apenas iniciado, mostrando que a MEX2 induziu a proliferação celular.

Em relação a apoptose, o índice foi estimado pela quantificação dos hepatócitos imunomarcados dividido pela área dos fragmentos. As áreas foram medidas no programa de análise de imagens KS300 (CarlZeiss®) e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico convencional. Assim o índice apoptótico foi obtido em hepatócitos imunomarcados/ mm^2 , assim como para a proliferação celular. Os grupos apresentaram baixo índice de apoptose, sendo o menor o grupo 1 (0.156 ± 0.370) e o maior o grupo 2 (0.653 ± 0.963), sem diferenças estatisticamente significantes.

Abstract

The use of pesticides in Brazil has intensified over the years. And since 2009 it was ranked as the largest market for pesticides worldwide. The consequential diffuse contamination of the environment is therefore due to the increasing number of chemicals of different classes, origins and modes of action. Little is known about the action of pesticides on human health in situations of co-exposure. Possible toxic effects are not restricted to agricultural and industrial workers, but also the general population that may be exposed continuously to its residues in food and water. Although these pesticides are mostly present in the environment at low doses, it must be considered that possible cumulative or synergistic effects may occur when there are concurrent or sustained exposure for two or more of these agents, which can lead to late manifestation of subclinical damages, sometimes irreversible. Thus, the specific objective of this study was to assess the effect of carcinogenesis promotion of a mixture of pesticides at low doses and analyze the phenomena of cell proliferation and apoptosis in rat liver.

A total of 50 male Lewis rats was separated into 5 groups for 8 weeks in a medium term hepatocarcinogenesis model. The three different classes of pesticides (dieldrin, dicofol, endosulfan, dichlorvos and permethrin), whose residues were detected by ANVISA during the period from 2001 to 2005 in tomatoes cultures, were added to the feed of rats initiated to hepatocarcinogenesis with diethylnitrosamine (DEN- 200mg/kg ip). We used two different mixtures, one with no toxic effects at doses (MEX1) referring to the NOEL (no-observed-effect level) and another at doses LOEL / LEL / LOAEL (Lowest-observed-effect level / Lowest-effect level / Lowest -observed-adverse-effect level), to the installation of adverse effects (MEX2), derived from chronic studies. All animals underwent partial hepatectomy at week 3. The distribution of the experimental groups were as follows: negative control, DEN, MEX1, DEN + MEX1 and DEN + MEX2. All animals were euthanized at the 8th week, and their livers collected. Histological sections obtained from the liver of animals were immunostained with monoclonal antibody anti-Ki-67 antigen to assess cell proliferation, and antibody anti-cleaved caspase-3, to evaluate apoptosis, and the slides were then counter stained with hematoxylin.

The cell proliferation index was estimated by the quantification of hepatocyte nuclei positive for Ki-67 in conventional optical microscope using a millimeter grid. It were examined 50 fields under magnification 400x, so each grid corresponded to 0.25 mm². The index was determined by dividing the overall number of Ki-67 positive hepatocytes by field,

multiplied by the area of the millimeter grid. Then, was obtained an amount of immunostained hepatocytes/mm². Statistical analysis for the cell proliferation index was made with the Tukey test and showed no difference between the group initiated with DEN (6,152 $\pm$ 2,608) and initiated with DEN + MEX1 (7.100 $\pm$ 2.778), showing that the mixture of pesticides in low doses did not induce an increase in hepatic cell proliferation. Treatment with DEN + MEX2 (8.389 $\pm$ 3.340) showed a significant increase in proliferation index when compared to the group just initiated, showing that MEX2 induced cell proliferation.

The apoptosis index was estimated by quantified immunostained hepatocytes divided by the area of the fragments. The area were measured at the KS300 image analysis software (CarlZeiss ®) and the slides were analyzed in conventional optical microscope. Thus the apoptotic index was obtained in immunostained hepatocytes/mm², as well as cell proliferation. The groups showed a low rate of apoptosis, the lowest was group 1 (0.156 $\pm$ 0.370) and the largest group 2 (0.653 $\pm$ 0.963), no statistically significant differences.

Introdução

Praguicidas no Brasil

O Brasil encontra-se entre os maiores consumidores de agrotóxicos. Com uma área cultivada de 68,1 milhões de hectares e com a expansão estimada para o setor agrícola, o Brasil é considerado o país que mais deve crescer nesse setor nos próximos anos (IBGE, 2011; OECD/FAO, 2010) (Figura 1). Para atender a demanda da produção em massa de alimentos, a utilização de agrotóxicos vem se tornando maior a cada década. Por outro lado, a liberação destes compostos químicos no ambiente, leva ao seu possível acúmulo no solo, rios, lençóis freáticos, além de seus resíduos serem encontrados nos alimentos consumidos. Sem os devidos cuidados de utilização, podem levar ao aumento do risco de seus efeitos nocivos não apenas nos trabalhadores agrícolas, que estão expostos continuamente de modo ocupacional, mas também da população em geral, que se expõe a resíduos na alimentação. Ainda que seja em baixas doses, este tipo de exposição crônica e involuntária gera questões sobre quais e como podem ser os seus efeitos nocivos à saúde humana.

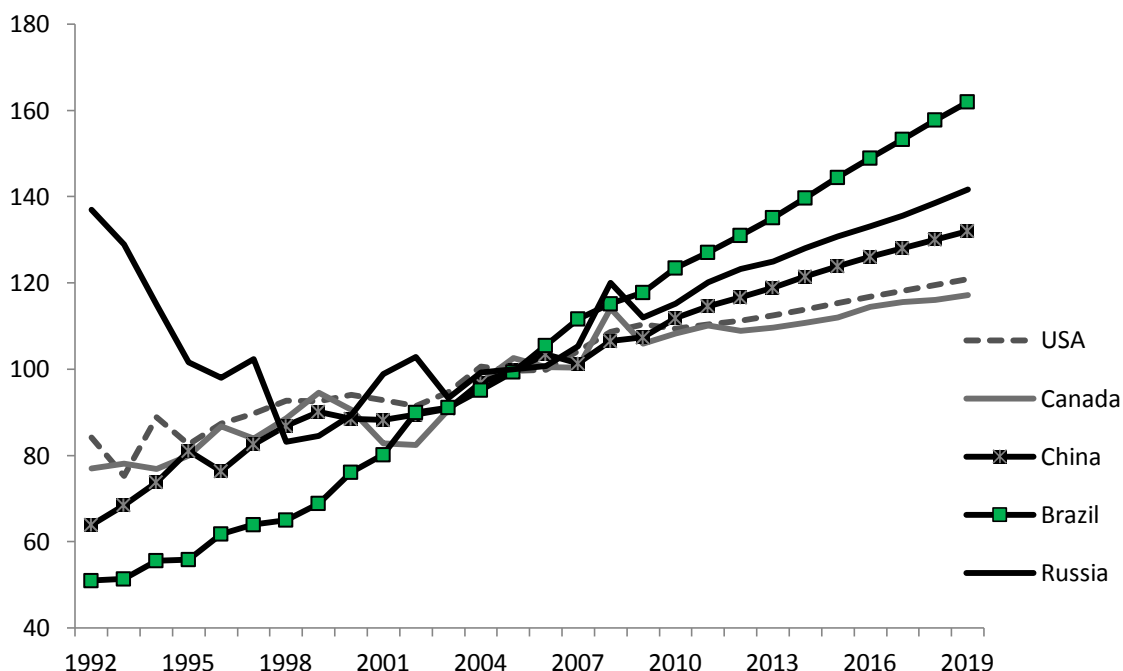


Figura 1 – Produção agrícola de países selecionados. O Brasil é o país cujo setor agrícola cresce mais rápido, mais de 40% até 2019, quando comparado ao período base 2007-2009. OECD-FAO Agricultural Outlook 2010-2019.

Para que o risco de causar danos à população, a partir da exposição alimentar, seja minimizado, a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabelecem índices de referência que objetivam exposições seguras. Assim, a ingestão diária aceitável (IDA) de resíduos de determinado praguicida é um valor que, baseado em conhecimento toxicológico atualizado sobre aquele

agente químico, indica que é improvável que a exposição à resíduos de determinados defensivos agrícolas represente qualquer risco à saúde humana, mesmo se ingeridos pelos indivíduos durante toda sua vida. A IDA de determinado pesticida é geralmente obtida a partir do NOAEL (*no-observed-adverse-effect-level*, nível sem efeito adverso observável), parâmetro toxicológico estimado em estudos de toxicidade com animais de laboratório e corrigido, para os seres humanos, por fatores de segurança que podem variar de 10 a 2.000 vezes (WHO, 1962; Lu, 1988; 1991).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolve o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que avalia resíduos de praguicidas em alimentos frescos à disposição da população. Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o PARA pesquisou 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletados em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 apresentaram algum tipo de resíduo de praguicidas, sendo que 931 (28,5%) continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) ou continham resíduos de produtos não-autorizados para aquele tipo de cultura. As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente nos tomates, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endossulfam, monocrotofós, clorpirifós e diclorvos) e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2005).

Dentre os praguicidas encontrados pela ANVISA como contaminantes naquele momento, três são organoclorados (dicofol, dieldrin e endossulfam), cinco são organofosforados (diclorvos, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós) e dois pertencem à classe dos piretróides (permetrina e cialotrina). Embora o potencial cancerígeno dos praguicidas organoclorados seja controverso (devido a grande variedade de substâncias pertencentes a este grupo e às diferenças entre protocolos epidemiológicos e experimentais, e espécies animais utilizadas para estudar este potencial), existem inúmeras evidências associando-os à promoção da carcinogênese (Flodström et al., 1990 in liver; Grimalt et al., 1994; Savitz, 1994; Hoyer et al., 1998; Aronson et al., 2000; Ward et al., 2000), inclusive evidências epidemiológicas relacionando câncer de mama a uma mistura de organoclorados (Boada et al, 2012).

Por outro lado, os praguicidas diclorvos e permetrina são apontados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como apresentando evidências sugestivas

de potencial cancerígeno, quando testados em roedores (USEPA, 2004). A avaliação do perigo e da exposição aos diferentes tipos de praguicidas é complexa e devemos considerar que possíveis efeitos cumulativos ou sinérgicos podem ocorrer quando há exposição concomitante e ou prolongada a dois ou mais destes agentes.

No presente estudo foram utilizados cinco praguicidas cujos resíduos foram encontrados com irregularidades em tomates. O diclorvós é um inseticida organofosforado que apresenta baixa persistência, meia-vida de sete dias no solo e quatro dias na água. É bastante volátil e seus resíduos são degradados para metabólitos menos tóxicos no ar e água. (CETESB, 2012). É classificado no grupo 2B, possível cancerígeno humano, pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), pela suspeita de formação de tumores de estômago e leucemia em roedores expostos ao inseticida, ainda que esses estudos sejam controversos. (IARC, 1991; Koutros et al., 2008; Ishmael et al., 2006)

O Dieldrin é um organoclorado sintético persistente, por isso, pode ser encontrado até hoje no ambiente mesmo não sendo mais utilizado. É altamente lipossolúvel que, juntamente com a alta persistência, faz com que possua uma grande capacidade de bioacumulação e biomagnificação. As intoxicações crônicas geralmente ocorrem por exposição simultânea ao aldrin, dieldrin e endrin e foram associadas ao aumento de câncer hepático e biliar, ainda que o estudo apresentasse limitações como a ausência de informações sobre os níveis de exposição (ATSDR, 2002). O endossulfam é um inseticida organoclorado persistente, que tem seu uso proibido ou restringido em vários países (USEPA, 2010). No Brasil, o registro de nove produtos a base de endossulfam foram cancelados e foi estabelecida uma retirada programada do ingrediente ativo do mercado brasileiro, com o cancelamento da comercialização de todos os produtos formulados à base de endossulfam para julho de 2013 (ANVISA, 2010). Pesquisas recentes sugerem que o endossulfam pode causar algumas alterações histopatológicas no fígado de ratos, mas os dados não são conclusivos. (Alva et al., 2012; Uboh et al., 2011)

O dicofol é um acaricida organoclorado persistente, cuja estrutura é similar ao DDT. Em estudos com camundongos, apresentou aumento na incidência de adenomas e carcinomas no fígado de machos, em doses de 260 e 530 mg/kg. Em estudo com ratos, não apresentou carcinogenicidade em doses até 250 mg/kg (WHO/FAO, 1996). No entanto, estudos mostram que esse pesticida pode levar a indução de citocromo P450 e aumentar a atividade da glutathione-S-transferase e da superóxido dismutase no fígado, em doses de 10 e 25 mg/kg (Chan et al, 2009).

A permetrina é um piretróide sintético de amplo espectro, listado como de uso restrito pela USEPA devido a sua alta toxicidade a organismos aquáticos. É classificado como provável carcinógeno humano por via oral baseado em tumores benignos de pulmão e fígado em camundongos e evidências de carcinogenicidade em ratos (USEPA, 2006).

Mistura de praguicidas em baixas doses

Durante todo o período de vida dos seres humanos, a exposição a várias substâncias químicas ocorre de forma não intencional ou acidental e concomitante (Yang, 1998). Isso difere das condições artificiais dos estudos com animais de experimentação, que são realizados com substâncias individuais, com alto nível de pureza, para identificação de efeitos tóxicos potenciais (sistêmicos, neurológicos, comportamentais, cancerígenos, reprodutivos, etc.) e por períodos determinados (Viau, 2002). Como resultado, há relativamente pouca informação epidemiológica e experimental sobre se, e como, a co-exposição pode afetar a saúde humana e animal (Carpenter et al., 1998). Isto também ocorre em virtude do número significativo de fatores que complicam a avaliação das misturas químicas. Por exemplo, dois ou mais compostos podem ter efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos sobre um mesmo órgão ou sistema-alvo, do mesmo modo que podem resultar em grande número de subprodutos, gerando novos metabólitos tóxicos (Yang, 1998).

Assim, o estudo de co-exposição química sobre organismos superiores é uma área complexa e relevante de pesquisa, devido ao seu impacto na avaliação do risco das populações humanas expostas aos múltiplos contaminantes químicos ambientais. A disponibilidade de modelos animais já bem estabelecidos para ensaios de toxicidade, em particular os de carcinogênese química, adicionados de técnicas sensíveis para sua avaliação, permite o estudo e a caracterização consistente dos efeitos das misturas químicas, tal como é necessário nesta área de avaliação do impacto dos contaminantes ambientais sobre a saúde humana (Suk et al., 2002).

Carcinogênese química de múltiplas etapas em fígado de ratos (modelos experimentais)

A caracterização das múltiplas etapas da carcinogênese, denominadas iniciação, promoção e progressão (Rous e Kidd, 1941; Berenblum e Shubick, 1947; Pitot e Dragan,

1991; Pitot, 1993), representou um passo importante nos estudos em carcinogênese química, pois permitiu analisar o desenvolvimento das neoplasias de modo seqüencial, bem como elaborar protocolos experimentais que possibilitam a identificação do potencial cancerígeno de agentes químicos em cada uma destas fases (Shirai, 1997; Ito et al., 1988; 2003).

A iniciação caracteriza-se pela alteração do genoma induzida por um agente genotóxico. Posteriormente, a divisão celular “fixa” essas lesões, dando origem a mutações nas células filhas (Cayama et al., 1978; Kaufmann et al., 1991). Essas mutações podem ocorrer em seqüências críticas do genoma, como em oncogenes, genes supressores de tumores (relacionados à regulação de processos de proliferação, apoptose e diferenciação celular) e genes relacionados ao reparo do DNA, entre outros (Bos e Kreijil, 1992; Afshari e Barret, 1993). A etapa de promoção envolve a seleção e proliferação clonal das células já “iniciadas”. Os agentes promotores podem ser genotóxicos ou não, agindo de maneira variada para aumentar a proliferação celular. Esta é uma etapa reversível e sua manutenção depende da dose e do intervalo entre as exposições à substância promotora (Pitot, 1993). Finalmente, a progressão é caracterizada por instabilidade genômica, que culmina no surgimento de aberrações cromossômicas (Pitot, 1993). Em consequência, há divisão celular descontrolada e contínua, com acúmulo sistemático de erros genéticos. Nesta etapa são observadas aneuploidias nas células neoplásicas, expansão seletiva de clones mais agressivos e manifestação do caráter maligno da neoplasia (invasão local e metástases).

A carcinogênese química de múltiplas etapas pode ser bem demonstrada no fígado de ratos, onde é caracterizada pelo aparecimento sucessivo de focos de hepatócitos alterados (FHA), nódulos proliferativos, e tumores malignos (hepatocarcinomas). Em última análise, os FHA são lesões préneoplásicas, marcadores histológicos do desenvolvimento potencial de futuras neoplasias (Farber e Sarma, 1987; Bannasch et al., 2002). Esse processo é parcialmente devido ao desequilíbrio entre os fenômenos de proliferação celular e de apoptose (Schulte-Hermann et al., 1995; Goldsworthy et al., 1996). Por isto, a avaliação qualitativa dos fenômenos de proliferação e apoptose em modelos experimentais de carcinogênese constitui importante ferramenta para compreensão do modo de ação dos cancerígenos químicos.

Durante a década de 1970, foram propostos vários modelos de hepatocarcinogênese química no rato (Kuhn et al., 1990). Dentre eles destacou-se o protocolo de Solt e Farber (1976), que permite detectar e quantificar separadamente e em tempo relativamente curto as atividades iniciadoras e promotoras dos hepatocancerígenos. Em 1988, Ito e cols., baseando-

se no modelo de Solt e Farber (1976), propuseram um protocolo de oito semanas de duração. O parâmetro final desse protocolo é o desenvolvimento de FHA que expressam a enzima glutathione-S-transferase forma placentária (GST-P), excelente marcadora de lesões pré-neoplásicas hepáticas (Tatematsu et al., 1987; Tsuda et al., 2003). Os aumentos do número e tamanho dos focos nos grupos tratados com a substância teste em relação aos grupos controle negativo são usados para documentar o potencial cancerígeno promotor da substância avaliada. Este modelo experimental, delineado inicialmente para detecção do potencial hepatocancerígeno de uma única substância, já foi utilizado para o estudo da exposição a misturas em baixas doses de 20 e 40 praguicidas de classes químicas variadas, no entanto nestes protocolos não foram explorados aspectos referentes ao modo de ação no processo de hepatocarcinogênese, como os fenômenos de proliferação e morte celular (Ito et al., 1998a; 1998b).

Proliferação Celular e Morte Celular (Apoptose)

A proliferação celular é uma das características mais importantes das células cancerígenas. Tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e liberação de sinais que promovem o crescimento e instruem na entrada e progressão no ciclo de crescimento de divisão celular, assim garantindo a homeostase do número de células e manutenção da arquitetura e função do tecido normal. As células cancerígenas tem esses sinais desregulados, de forma que sua proliferação é aumentada. No entanto, uma célula cancerígena não tem apenas a proliferação desregulada, são necessárias outras alterações para a transformação maligna da célula, mas o aumento da proliferação é um parâmetro que pode identificar a maior propensão ao desenvolvimento do câncer. Agentes químicos que tem a capacidade de aumentar a proliferação celular significativamente também são considerados agentes promotores da carcinogênese (Hanahan et al., 2011).

O Ki-67 é uma proteína que está presente no núcleo das células quando elas estão nas fases G1, S, G2 e na mitose do ciclo celular, mas não está presente quando a célula está quiescente, ou seja, quando não está proliferando. Por isso, o Ki-67 é um excelente marcador para células proliferativas. Sua função no ciclo celular ainda não é muito bem conhecida, mas parece estar relacionada a transcrição de RNA ribossomal. (Scholzen et al., 2000; Rahmanzadeh et al., 2007)

A morte celular programada ou apoptose relaciona-se a carcinogênese de forma que um aumento na quantidade de apoptose sugerem danos às células, que eventualmente podem

não ser letais e se a célula se proliferar, teremos uma célula iniciada. Mas também pode se relacionar ao câncer quando há uma diminuição da morte celular, sugerindo que as células de alguma forma estão escapando da apoptose, que é uma das características de células cancerígenas. O processo de apoptose precisa ser muito bem controlado, pois defeitos na maquinaria apoptótica levarão a célula a um maior tempo de vida e podem contribuir para a expansão da célula neoplásica. A sobrevivência extendida da célula também cria um ambiente permissivo para a instabilidade genética e acúmulo de mutações. (Andreeff et al., 2000)

A apoptose pode ocorrer por duas vias: a extrínseca, ou via do recetor de morte, e a intrínseca, ou via mitocondrial. Essas vias também estão ligadas, então moléculas de uma via podem influenciar a outra, e no final, convergem para um mesmo caminho, a via de execução. A via de execução é iniciada pela clivagem da caspase 3 e resulta em fragmentação do DNA, degradação do citoesqueleto e proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e finalmente são fagocitadas. Por ser comum às duas vias da apoptose e por ser uma molécula precoce na apoptose, a caspase 3 clivada é um marcador bastante utilizado para apoptose. (Elmore, 2007)

Objetivo

Objetivo Geral

Avaliar o efeito promotor da carcinogênese de uma mistura de cinco praguicidas em um modelo de iniciação-promoção da hepatocarcinogênese.

Objetivo Específico

Analisar os índices de proliferação celular e apoptose através de imunohistoquímica em fígado de ratos Lewis expostos a uma mistura de cinco praguicidas em níveis de NOEL e LOAEL/LOEL (diclorvos, dicofol, dieldrin, endossulfam e permetrina).

Materiais e Métodos

Reagentes

1) O reagente utilizado para iniciação da hepatocarcinogênese foi a N dietilnitrosamina (DEN) (Sigma Chemical Company, USA, Catálogo No. 0756; 2)

2) Reagentes principais utilizados na marcação imunoistoquímica: Anticorpo Ki-67 (clone SP6, Abcam). Caspase-3 clivada, anticorpo Cleaved Caspase 3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

3) Pesticidas:

Dicofol (C₁₄H₉Cl₆O) CAS 115-32-2. Produto técnico com concentração do

ingrediente ativo (IA) de 96,3%; (Milenia Agrociências S/A, Londrina, PR. (Anexo 1)

Diclorvos (C₄H₇Cl₂O₄P), CAS 62-73-7. Produto analítico com concentração do IA de 98,8%; (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA). (Anexo 2)

Permetrina, mistura de isômeros *cis* e *trans* (C₂₁H₂₀Cl₂O₃), CAS 52645-53-1, produto analítico com concentração do IA de 98,0%; (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA). (Anexo 3)

Endossulfam, mistura de isômeros *alfa* e *beta* (C₉H₆Cl₆O₃S), CAS 115-29-7, produto técnico com concentração do IA de 98,0 %; (Bayer CropScience S/A, Belford Roxo, RJ). (Anexo 4)

Dieldrin (C₁₂H₈Cl₆O), CAS 60-57-1, produto técnico com concentração do IA de 90% (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA).

Animais e ambiente de experimentação

Ratos isogênicos machos da linhagem Lewis, provenientes do Biotério do CEMIB, UNICAMP, com peso médio de 220 g e a idade aproximada de oito semanas, foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMB sob condições ambientais controladas de temperatura (22±20C), umidade relativa do ar (55±10%), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e circulação contínua de ar. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (04 animais/gaiola), forradas com maravalha de pinho branco autoclavada e fechadas com grades de inox, trocadas e limpas três vezes por semana. O período de aclimação foi de duas semanas.

Avaliação dos animais durante o experimento

Os animais foram pesados e submetidos à avaliação clínica semanal. Todas as alterações foram registradas em fichas individuais.

Adição dos praguicidas à ração e tratamento dos animais

A ração semipurificada em pó foi produzida pela nutricionista Nádia Fátima Gibrim Pereira Dias (Campinas, SP), com formulação livre de resíduos de praguicidas, e constituída segundo a ração AIN-93M do Instituto Americano de Nutrição (Reeves et al., 1993). A ração em pó foi acrescida da mistura de praguicidas, homogeneizada e peletizada no dietário experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Os diferentes tipos de ração foram identificados, embalados e conservados sob refrigeração a -20°C. As concentrações dos praguicidas nas rações dependeram dos respectivos NOEL ou LOEL/LEL/LOAEL, tal como determinados em ensaios crônicos com ratos (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993). Estas doses críticas foram transformadas em concentrações, baseadas na estimativa de 20g/rato/dia como o consumo de ração pelo animal adulto, que definiram as quantidades de praguicidas adicionados as rações. Desta maneira, dependendo das concentrações dos praguicidas, foram constituídas duas misturas: a MEX1, na qual os praguicidas foram misturados em nível de seus respectivos NOEL/NOAEL e a MEX2, na qual as substâncias foram misturadas conforme seus respectivos LEL/LOEL/LOAEL.

O consumo diário de ração foi avaliado pela diferença de peso entre o oferecido e o restante, após 48 horas. O consumo de água, medido pelo peso dos bebedouros ao fornecimento e após 48 horas.

Protocolo Experimental

Os fígados que tiveram seus índices de proliferação e morte celular avaliados foram derivados de experimento prévio, que consistiu de um estudo de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese com duração de 8 semanas. Foram utilizados 50 ratos, distribuídos ao acaso em cinco grupos com 10 animais (Figura 2)

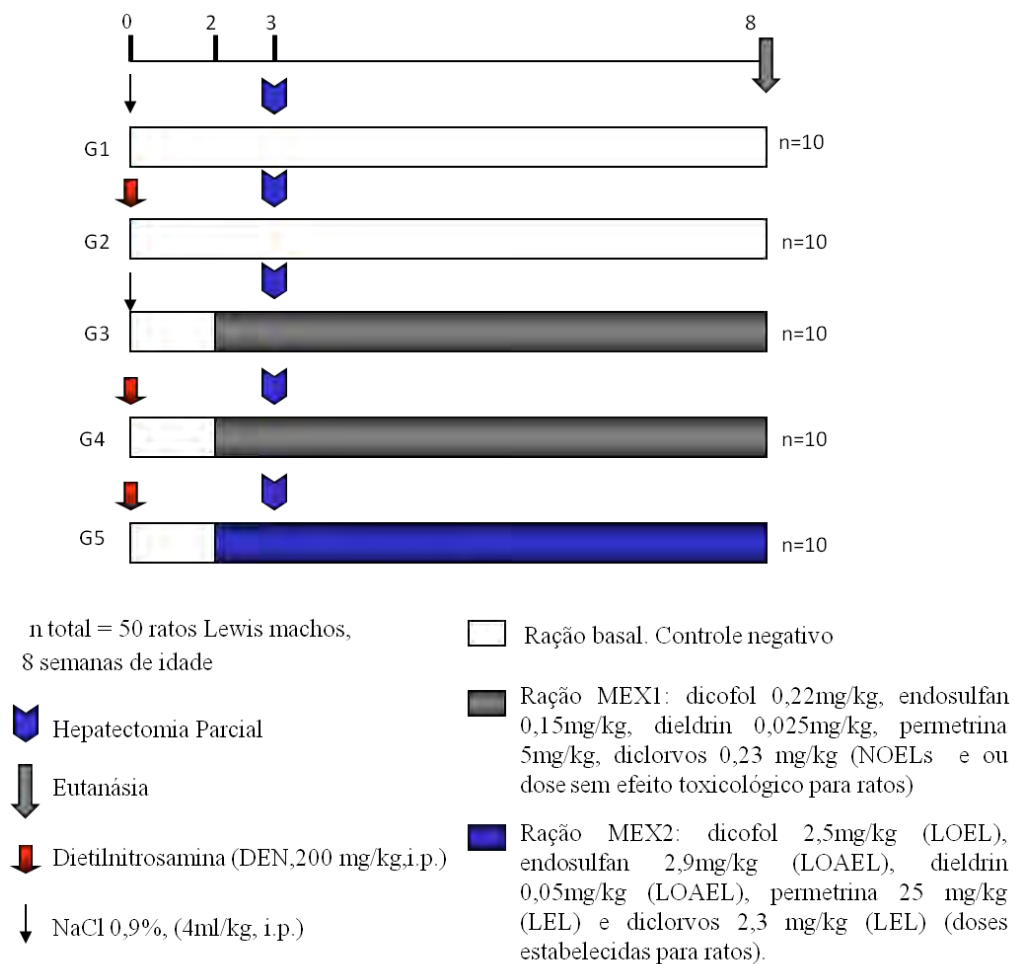


Figura 2. Delineamento do Experimento.

Grupo 1: Controle negativo. Solução NaCl 0,9% i.p. na 1ª semana, hepatectomia parcial (HP) na 3ª semana e alimentação com ração semipurificada basal, *ad libitum*, da 2ª à 8ª semana.

Grupo 2: Controle de iniciação da carcinogênese. Solução de DEN, 200 mg/kg i.p. na 1ª semana, HP na 3ª semana e ração basal *ad libitum*, da 2ª à 8ª semana.

Grupo 3: Grupo não iniciado para carcinogênese e tratado com a mistura experimental de cinco praguicidas (MEX1). Solução de NaCl 0,9% i.p. na 1ª semana, hepatectomia parcial (HP) na 3ª semana e ração MEX1: dicofol 0,22mg/kg, endossulfam 0,15mg/kg, dieldrin 0,025mg/kg, permetrina 5 mg/kg e diclorvos 0,23mg/kg, *ad libitum*, da 2ª à 8ª semana. As concentrações dos praguicidas na MEX1 correspondem aos NOEL ou doses sem efeito toxicológico dos respectivos praguicidas para ratos (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993).

Grupo 4: Grupo iniciado para carcinogênese com DEN, 200 mg/kg, i.p. na 1ª semana, HP na 3ª semana e ração com a MEX1, conforme item anterior a partir da 2ª. semana.

Grupo 5: Controle positivo. Grupo iniciado para carcinogênese com DEN, 200 mg/kg, i.p. na 1ª semana e HP na 3ª semana, alimentado com uma mistura MEX2 visando instalação de efeitos adversos: dicofol 2,5mg/kg, endossulfam 2,9mg/kg, dieldrin 0,05mg/kg, permetrina 25 mg/kg e diclorvos 2,3mg/kg *ad libitum*, da 2ª à 8ª semana. As concentrações da MEX2 correspondem aos LOAELs (*lowest observed level adverse effect* = menor nível de efeito adverso observável) dos praguicidas dieldrin e endossulfam, ao LOEL (*lowest observed effect level*) para o dicofol e aos LELs (*lowest effect level*) do diclorvos e permetrina (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993).

Hepatectomia Parcial (HP)

Para expansão clonal e fixação das lesões causadas pela dietilnitrosamina, foi feita a retirada de 2/3 do fígado. A HP foi realizada após anestesia com 40 mg/kg i.p. de pentobarbital sódico 4%. Após incisão na linha abdominal mediana, foram retirados os lobos lateral esquerdo e mediano do fígado (2/3 do órgão). A sutura da musculatura e pele da parede abdominal foi feita com fio de sutura nº 30, em pontos simples isolados. No pós-operatório os animais foram aquecidos por fonte de luz até retorno da anestesia, recebendo soro fisiológico pelos bebedouros, por 24 horas. A cicatrização da incisão cirúrgica e a condição geral dos animais foi acompanhada por médico veterinário.

Eutanásia e coleta do fígado

Em ambos os experimentos, os animais foram eutanasiados ao final da 8ª semana de tratamento pela secção dos vasos da base do coração após narcose induzida em câmara de CO₂. O fígado foi coletado, pesado e após o exame macroscópico fragmentos representativos foram fixados em formalina 10% tamponada por 48 horas, lavados com água e conservados em álcool 70%. A seguir, os fragmentos foram processados para inclusão em parafina.

Processamento do fígado para marcação imunoistoquímica

Para cada imunohistoquímica foram obtidos cortes histológicos de 3 micra de espessura sobre lâminas silanizadas (HDA, USA) que foram submetidas à imunomarcção

com os anticorpos: monoclonal anti-antígeno de proliferação celular Ki-67 (clone SP6, diluição 1:100, ABCAM), e anticorpo anti-caspase-3 clivada (diluição 1:100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina.

Para a imunohistoquímica anti-Ki-67 foi feito o seguinte procedimento: Desparafinização da lâmina em xilol, passagem em etanol absoluto e hidratação. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% e recuperação antigênica em ácido cítrico 0,21% pH 6.0 em câmara de pressão (PASCAL) a 120° C por 3 minutos. Incubação com o anticorpo primário (KI-67 - clone SP6 - 1:100 - ABCAM) em sistema overnight. No dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (LSAB - LINK - K0609 - DAKO) por 30 minutos. Incubação com o anticorpo terciário (LSAB - Streptavidina - K0609 - DAKO) por 30 minutos. Revelação com 3,3-Diaminobenzidina (K3468 - DAKO) por 5 minutos. Contra-coloração com hematoxilina e finalmente, desidratação em etanol absoluto, diafanização em xilol e montagem em resina sintética.

Para a imunohistoquímica anti caspase 3 clivada foi feito o seguinte procedimento: Desparafinização da lâmina em xilol, passagem em etanol absoluto e hidratação. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% e recuperação antigênica em ácido cítrico 0,21%) em forno microondas por 15 minutos, na potência máxima. Incubação com o anticorpo primário anti caspase-3 clivada (diluição 1:100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) por 30 minutos. Em seguida incubação com Sistema LSAB - DAKO, pronto para uso, por 30 minutos. Revelação com 3,3-Diaminobenzidina (K3468 - DAKO) por 5 minutos. Contra-coloração com hematoxilina e finalmente, desidratação em etanol absoluto, diafanização em xilol e montagem em resina sintética.

Análise e quantificação da proliferação celular e apoptose

Para estimativa do índice de proliferação nos fragmentos de fígado, as lâminas imunomarcadas com o anti-Ki-67 foram analisadas em microscópio óptico convencional com uma das oculares contendo uma gradícula milimetrada (Eyepiece Micrometer Olympus®, Japan) que no aumento de 400x corresponde a 0,25 mm². Foram analisados 50 campos em cada lâmina resultando em uma área total analisada de 12,5 mm². A quantidade total de

marcações positivas para Ki-67 foi dividida pela área total analisada, gerando assim, a quantidade de hepatócitos/mm².

Para estimativa do índice de morte celular por apoptose, as lâminas imunomarcadas com anti caspase-3 clivada tiveram a área dos fragmentos determinada pelo programa de análise de imagens KS300 (CarlZeiss®). Em seguida, toda a extensão dos fragmentos foi examinada em microscópio óptico convencional para quantificação dos hepatócitos marcados positivamente para caspase-3 clivada. A quantidade de hepatócitos marcados foi dividida pela área total do fragmento, gerando o índice de apoptose, em hepatócitos marcados/mm².

Análise Estatística

A análise estatística foi feita pela Análise de variância e em seguida foi feito o teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos $P < 0,05$.

Resultados

Proliferação Celular

Os hepatócitos mostraram-se bem marcados facilitando a visualização e contagem. Os grupos 2, 4 e 5 apresentaram mais marcações Ki-67 positivas em relação aos grupos 1 e 3 (Figuras 3 e 4).

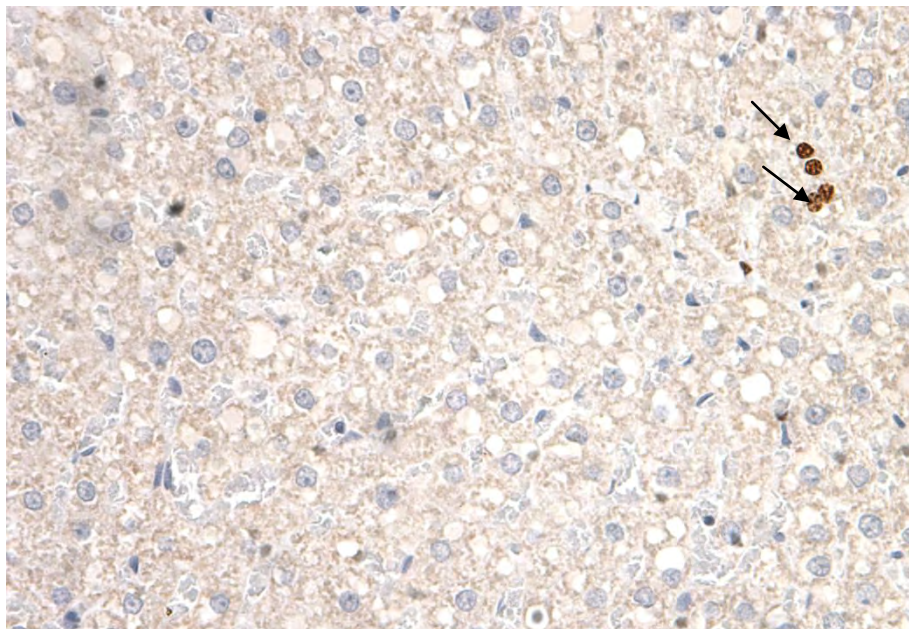


Figura 3. Grupo 1 (Controle negativo). Poucos hepatócitos marcados positivamente para Ki-67. Aumento 400x.

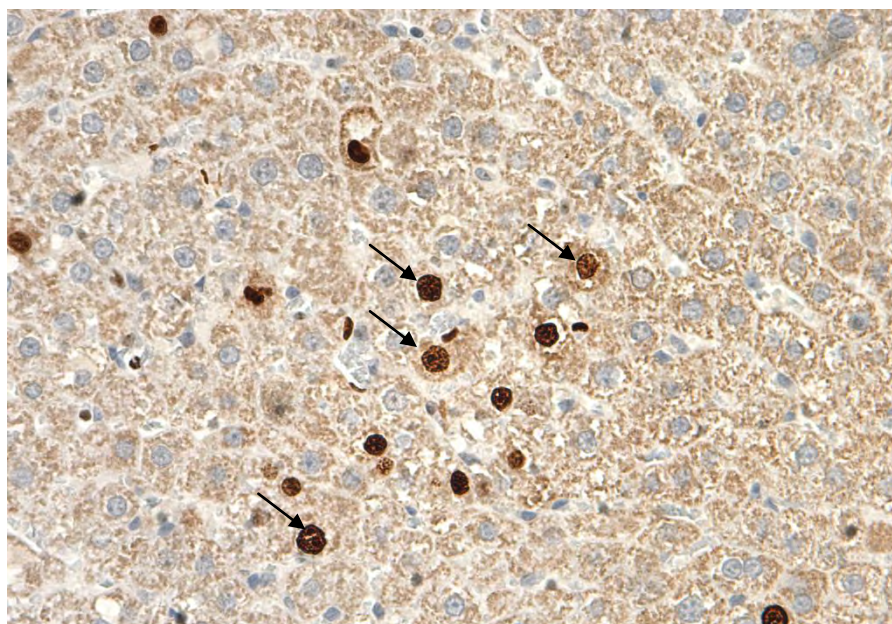


Figura 4. Grupo 4. Hepatócitos marcados positivamente para Ki-67. Aumento 400x.

O índice de proliferação celular apresentou-se aumentado no grupo 5, que foi iniciado e recebeu a ração nos níveis LOAEL/LEL, seguido pelos grupos 4, que foi iniciado

e recebeu a ração NOEL e grupo 2, apenas iniciado Os grupos não iniciados - controle negativo- e 3-ração NOEL- apresentaram os índices mais baixos de proliferação celular.

Tabela 1. Índice de Proliferação Celular hepático avaliado ao final da 8ª semana (média $\pm$ desvio padrão).

Grupo	Tratamento	Número de Animais	Índice de Proliferação Celular
G1	Controle Negativo	12	3.840 $\pm$ 1.271
G2	DEN	10	6.152 $\pm$ 2.608
G3	MEX1	11	3.909 $\pm$ 2.079
G4	DEN + MEX1	12	7.100 $\pm$ 2.778
G5	DEN + MEX2	11	8.389 $\pm$ 3.340 *

DEN: Dietilnitrosamina; MEX1: dicofol 0,22mg/kg, endossulfam 0,15mg/kg, dieldrin 0,025mg/kg, permetrina 5 mg/kg e diclorvos 0,23mg/kg; MEX2: dicofol 2,5mg/kg, endossulfam 2,9mg/kg, dieldrin 0,05mg/kg, permetrina 25 mg/kg e diclorvos 2,3mg/kg. Índice de Proliferação Celular: hepatócitos Ki-67 positivos/mm².

No entanto, apenas o grupo 5 apresentou um aumento significativo na proliferação celular em relação ao grupo apenas iniciado pela DEN.

Morte Celular (Apoptose)

Como os fenômenos de retração celular e formação de corpos apoptóticos são rápidos e os fragmentos são rapidamente fagocitados, a apoptose é um evento raro de se observar, especialmente em tecidos normais, de forma que, nestes, um número pequeno de células imunomarcadas é observado. No processo de análise, é necessária muita atenção para identificar as poucas células positivas. Além disso, a marcação citoplasmática da Caspase 3 é bem mais sutil e delicada que a marcação para Ki-67, exigindo mais atenção por parte do examinador, para identificar e contar os hepatócitos corretamente. Alguns hepatócitos podem apresentar uma leve marcação inespecífica que pode ser confundida com a marcação imunohistoquímica para caspase 3 clivada que normalmente deve ser citoplasmática, forte e homogênea. Além disso, a morfologia da célula deve ser analisada juntamente com a marcação (Figura 5). Para corroboração da expressão, devem ser adicionadas características nucleares típicas do processo apoptótico, como condensação, picnose, fragmentação e aproximação destes fragmentos à face interna da carioteca (Figura 7). A membrana celular também pode apresentar protrusões, chamadas *blebs*, prosseguindo para a divisão em vários corpos apoptóticos. A combinação da marcação para caspase 3 clivada com as características nucleares nas diferentes fases da apoptose (picnose ou cariorréxis), ou a persistência da marcação após a formação dos corpos apoptóticos que contenham, ou não,

fragmentos da cromatina são as características mais contundentes para determinação da positividade (Ziegler et al., 2004).

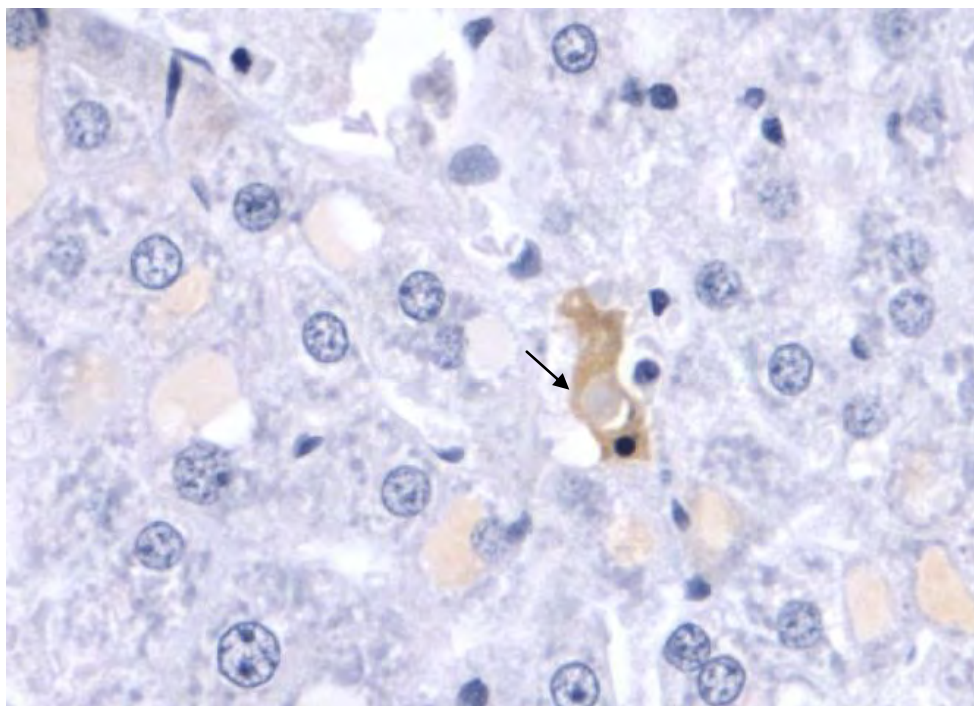


Figura 5. Grupo 1. Hepatócito imunomarcado para caspase 3 clivada, apresentando também núcleo condensado característico de apoptose. Aumento 400x, contracoloração de hematoxilina.

Alguns hepatócitos não apresentam marcação muito forte, mas pelas alterações morfológicas características da apoptose foi possível identificá-los (Figura 6).

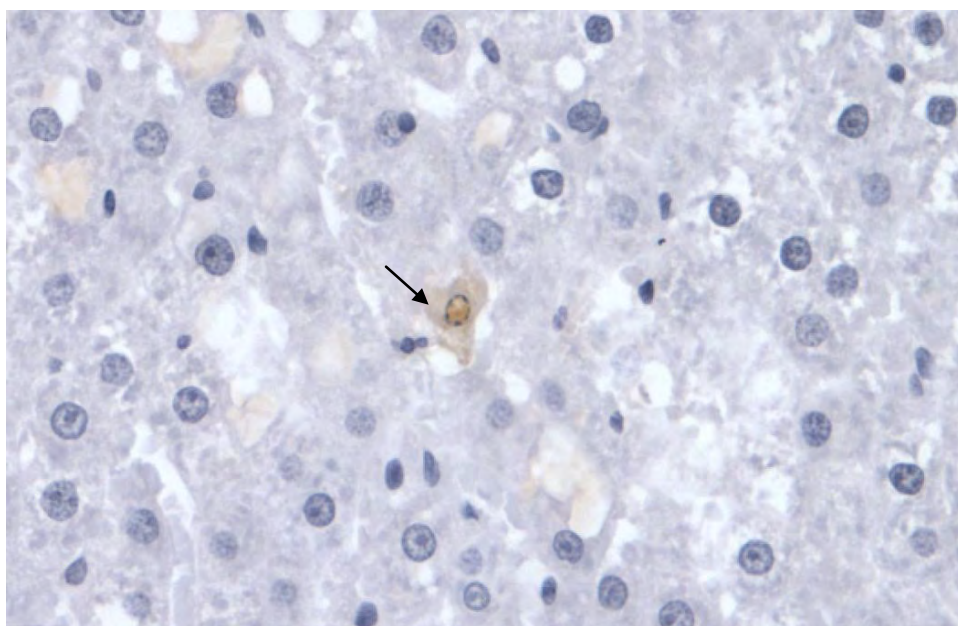


Figura 6. Grupo 2. Hepatócito imunomarcado positivamente para Caspase 3 clivada, apresentando cromatina condensada na membrana nuclear. Aumento 400x, contracoloração de hematoxilina.

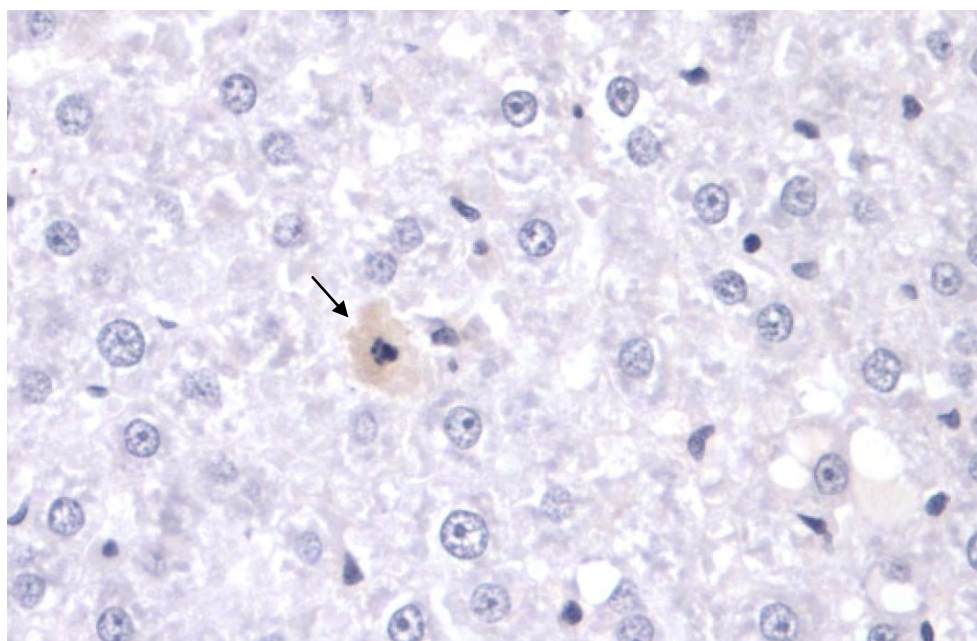


Figura 7. Hepatócito imunomarcado para Caspase 3 clivada, apresentando núcleo no início do processo de fragmentação. Aumento 400x, Contracoloração de hematoxilina.

O índice de apoptose hepático apresentou-se baixo em todos os grupos e não houve diferença estatisticamente significante entre os tratamentos.

Tabela 2. Índice de Apoptose hepático avaliado ao final da 8ª semana (média $\pm$ desvio padrão).

Grupo	Tratamento	Número de Animais	Índice de Apoptose
G1	Controle Negativo	12	0.156 $\pm$ 0.370
G2	DEN	10	0.653 $\pm$ 0.963
G3	MEX1	11	0.178 $\pm$ 0.325
G4	DEN + MEX1	12	0.335 $\pm$ 0.578
G5	DEN + MEX2	11	0.300 $\pm$ 0.374

DEN: Dietilnitrosamina; MEX1: dicofol 0,22mg/kg, endossulfam 0,15mg/kg, dieldrin 0,025mg/kg, permetrina 5 mg/kg e diclorvos 0,23mg/kg; MEX2: dicofol 2,5mg/kg, endossulfam 2,9mg/kg, dieldrin 0,05mg/kg, permetrina 25 mg/kg e diclorvos 2,3mg/kg. Índice de Apoptose: hepatócitos caspase 3 clivada positivos/mm².

Um dos animais tratados apenas com a dietilnitrosamina apresentou como alteração atípica a hiperplasia dos ductos biliares (Figura 8), não sendo incluso à análise estatística (*outlier*).

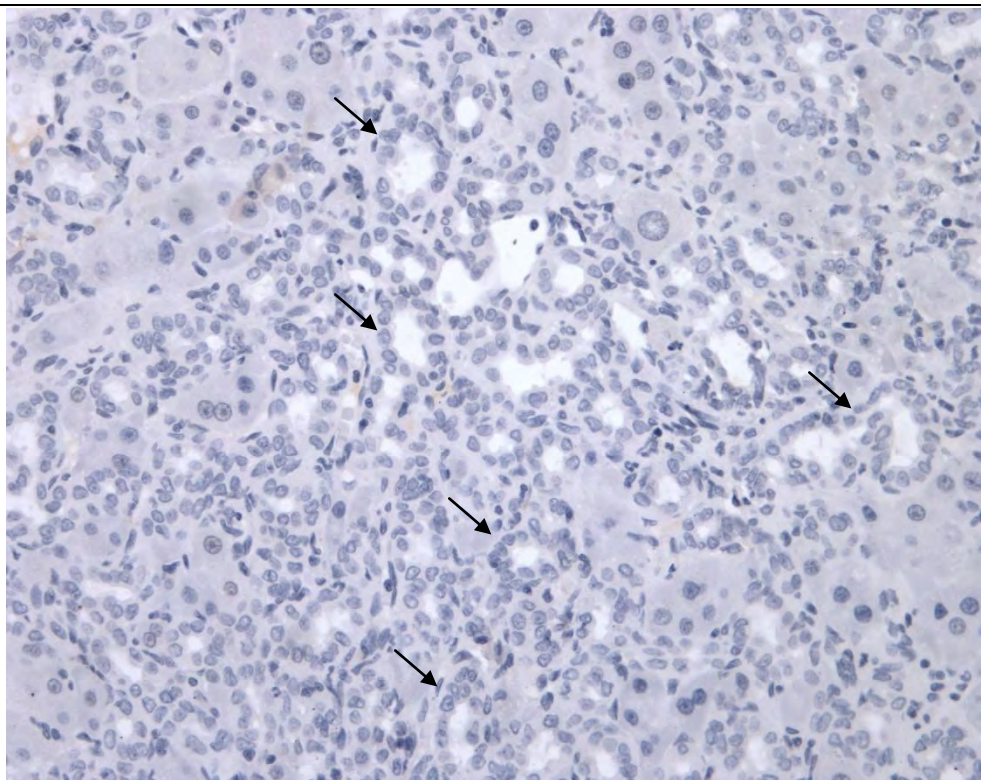


Figura 8. Grupo tratado com DEN apresentando hiperplasia de ductos biliares (animal *outlier*). Aumento 400x. (Setas indicando os ductos biliares hiperplásicos, Contracoloração de hematoxilina)

Discussão

Discussão

Nos relatórios mais recentes do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) algumas mudanças ocorreram em relação aos Programas anteriores. No PARA de 2010, a variedade de alimentos analisados dobrou, em relação ao período de 2001 a 2004, no qual baseou-se o presente estudo. Foram 18 alimentos monitorados: abacaxi, alface, arroz, batata, beterraba, cebola, cenoura, couve, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pepino, pimentão, repolho e tomate. A escolha dessas culturas baseou-se em dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação e no uso intensivo de agrotóxicos nestas culturas. Dessas variedades de alimentos tiveram 2488 amostras analisadas, sendo que em 37% não foram detectados resíduos de agrotóxicos, 35% apresentaram resíduos abaixo do LMR estabelecido, e 28% foram consideradas insatisfatórias por apresentarem resíduos de produtos não autorizados ou, autorizados, mas acima do LMR. Esses resultados não diferem muito dos encontrados na análise de 2001 a 2004, que tiveram 28,5% das amostras insatisfatórias (ANVISA, 2011).

No entanto, em relação aos resíduos encontrados, nos tomates não mais foram detectados os resíduos irregulares dos organoclorados dicofol e dieldrin, apenas os organofosforados diclorvós, metamidofós e clorpirifós, o piretróide permetrina, além do fungicida pirazofós. Um fator importante é que resíduos do endossulfam tem se mostrado recorrentes, apesar de resoluções que antecipam a proibição de seu uso a partir de 2013 (ANVISA, 2010). Desta forma, entre os organoclorados, o endossulfam foi o que apresentou mais irregularidades, como ingrediente ativo não autorizado em diversas culturas, sendo o 8º ingrediente ativo em maior número de amostras insatisfatórias. Nas outras culturas, resíduos irregulares de dieldrin também não foram encontrados e os resíduos de dicofol apareceram apenas como ingrediente ativo não autorizado em pimentões disponíveis para consumo (ANVISA, 2011).

O papel dos agentes químicos liberados no ambiente como causa potencial do câncer é estudado há décadas (Beremblum and Shubik, 1947; Wong et al., 1976). A dificuldade de se estabelecer evidências primárias por estudos epidemiológicos advém da enorme variedade de substâncias presentes no ambiente, gerando diferentes padrões de exposição com relação a dose, período e outros fatores que podem impossibilitar a associação de causalidade. Por isso, juntamente com as evidências epidemiológicas, deve-se somar as evidências experimentais que ocorrem em laboratório e possuem condições mais bem controladas. No

entanto, mesmo em condições controladas, o reconhecimento de uma associação causal é cheio de incertezas, porque ela depende de inúmeros fatores. Por exemplo, dependendo da suscetibilidade do organismo exposto (características genéticas, idade, estado de higiene) os efeitos de um agente químico podem ser diferentes. (de Camargo e Barros, 2011)

A avaliação do risco toxicológico é importante para subsidiar o gerenciamento do uso e exposição às substâncias de origem industrial e seus derivados, de modo a maximizar os benefícios e minimizar os efeitos nocivos à saúde humana e ambiental. Para isso, baseia-se em quatro componentes essenciais: a identificação do risco, a avaliação da dose-resposta, a avaliação da exposição e a caracterização do risco. A identificação do risco e a avaliação da dose-resposta acontecem simultaneamente, pois normalmente baseiam-se em fontes de informação comum, no entanto, a identificação do risco é uma avaliação qualitativa e a avaliação da dose-resposta é quantitativa. À partir dessas duas informações, segue-se o estudo da avaliação da exposição e da caracterização do risco. Entretanto, deve ser verificada a relevância que os resultados dos sistemas experimentais tem para a espécie humana. Em geral, nos estudos com animais de experimentação são utilizadas doses maiores que as exposições humanas reais, assim, são necessários dois tipos de extrapolação: das doses mais altas para as mais baixas – extrapolação entre doses, e a extrapolação de animais para o homem – extrapolação entre espécies. Nesse processo, que é uma das fases mais críticas da avaliação de risco, assume-se que a espécie humana é a mais sensível à substância de interesse, garantindo assim níveis realmente seguros de exposição. (de Camargo e Barros, 2011)

Este quadro se complica ainda mais quando diz respeito ao estudo das co-exposições e seu efeito sobre a saúde humana. Neste sentido, os estudos experimentais são a alternativa viável para a compreensão de se ou como exposições a misturas de substâncias químicas de relevância epidemiológica podem exercer efeito sobre vários fenômenos celulares como respostas degenerativas, adaptativas, citotoxicidade e carcinogenicidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar a proliferação celular e apoptose hepática em ratos submetidos a um modelo de iniciação e promoção de hepatocarcinogênese. Os parâmetros para estimar a quantidade destes fenômenos foram os índices de proliferação de hepatócitos Ki-67 positivos por área e número de hepatócitos e de apoptose por marcação da Caspase 3 clivada por área.

Os resultados obtidos mostram que apenas a MEX2 aumentou a proliferação celular dos hepatócitos de forma significativa. Este aumento provavelmente é devido à ação indutora de enzimas microssomais, já conhecida para os componentes da mistura (Flodstrom et al., 1990; Dubois et al., 1996; Coumoul et al., 2002; Abdou et al., 2010) que podem levar a

anormalidades hepatocíticas e proliferação celular em resposta à doses mais elevadas de agentes indutores (Maronpot et al., 2010). No entanto, a mesma mistura, quando analisada em relação ao número e área de focos GST-P positivos, neste mesmo protocolo, não apresentou aumento significativo nestes parâmetros quando comparada aos demais tratamentos (Controle negativo, DEN e DEN+MEX1). A MEX1, por sua vez, não apresentou aumento significativo da proliferação celular, sendo que no grupo 4 o aumento do índice de proliferação celular foi devido ao tratamento com a DEN. Dessa forma, nas condições estudadas, a co-exposição aos praguicidas diclorvós, dieldrin, endossulfam, dicofol e permetrina, nas doses NOEL não apresentou ação sobre a proliferação celular dos hepatócitos iniciados quimicamente. Em relação à apoptose, todos os grupos apresentaram baixos índices e não houve diferença significativa entre eles, sugerindo que as misturas MEX1 e MEX2 não apresentaram diferenças quanto à ação sobre este evento.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ABDOU R, SASAKI K, KHALIL W, SHAH S, MURASAWA Y, SHIMODA M. Effects of several pyrethroids on hepatic cytochrome P450 activities in rats. **J. Vet. Med. Sci.** v.72, n.4, p.425-33. 2010.
- AFSHARI, C. A.; BARRET, J. C. Cell cycle controls: potential targets for chemical carcinogens? **Environ. Health Perspect.**, v. 101, p. 9-14, 1993.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. **Relatório de atividades 2004**. Brasília, DF, 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de atividades 2004**. Brasília, DF, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 28, de 09 de agosto de 2010. Regulamento Técnico para o Ingrediente Ativo Endossulfam em decorrência da Reavaliação Toxicológica. 2010
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for aldrin/dieldrin**. Atlanta, 2002.
- ALVA, S.; DAMODAR, D.; D'SOUZA, A.; D'SOUZA, U.J.. Endosulfan induced early pathological changes in vital organs of rat: A biochemical approach. **Indian J Pharmacol.** v. 44, n. 4, p. 512-5. 2012.
- ANDREEFF, M.; GOODRICH, D. W.; PARDEE A. B.. Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. Cancer Medicine. 5th edition. 2000.
- BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q.; LI, HACKER, H.J.; NEHRBASS, D.; ALEEM, E. A. Significance of early cellular and molecular changes for the evolution and the prevention of liver cancer. **Research Report** 2001/2002.
- BEREMBLUM, I.; SHUBIK, P. The role of croton oil applications associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction of the mouse's skin. **Br. J. Cancer**, v. 1, p. 379-382, 1947.
- BOADA, L.D.; ZUMBADO, M.; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L.A.; ALMEIDA-GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ-LEÓN, E.E.; SERRA-MAJEM, L.; LUZARDO, O.P. Complex organochlorine pesticide mixtures as determinant factor for breast cancer risk: a population-based case-control study in the Canary Islands (Spain). **Environmental Health.** v. 11, n. 28. 2012.
- BOS, J.L.; KREIJL, C. F. Genes and genes products that regulate proliferation: critical targets in carcinogenesis. In: VAINIO, H.; MAGEE, P. N.; MCGREGOR, D. B.; McMICHAL, A. J. Mechanism of carcinogenesis in risk identification. **Lyon: IARC Sci. Publ.**, v. 116, p. 57-65.1992.
- CARPENTER, D. O. et al., Human Health and Chemical Mixtures: An Overview. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, p. 1263-1270, 1998.
- CAYAMA, E.; TSUDA, H.; SARMA, D. S.; FARBER, E. Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. **Nature**, v. 60, p. 60-62, 1978.
- CHAN W.H.; LIAO J.W.; CHOU C.P.; CHAN, P.K.; WEI, C.F.; UENG, T.H. Induction of CYP1A1, 2B, 2E1 and 3A in rat liver by organochlorine pesticide dicofol. **Toxicol. Lett.** v. 190, n. 2, p. 150-5. 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Ficha de Informação Toxicológica. **Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental**. 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Valores de Referência de Toxicidade para a saúde humana. São Paulo, SP. 2008.

COUMOUL, X.; DRY, M.; BAROUKI, R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. **Biochemical Pharmacology**, v. 64: p. 1513-9, 2002.

DAIL M.B, BURGESS SC, MEEK EC, WAGNER J, BARAVIK J, CHAMBERS JE. Spatial distribution of CYP2B1/2 messenger RNA within the rat liver acinus following exposure to the inducers phenobarbital and dieldrin. **Toxicol Sci**. v.99,n.1,p.35-42. 2007.

DE CAMARGO, J.L.V.; BARROS, S. B. M.Informações Científicas e Avaliação do risco toxicológico. Revista Brasileira de Toxicologia 24, n.1-2, p.1-9. 2011.

DUBOIS, M. et al., Selective induction of the CYP3A family by endosulfan and DNA-adduct formation in different hepatic and hepatoma cells. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 1, p. 249-256, 1996.

ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.** v. 35, n.4, p.495-516.2007.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Food Standards programme, Codex maximum limits for pesticide residues. 2. ed. **Rome: FAO/WHO**, 1986. v.13.

FARBER, E.; SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987.

FLODSTROM, S.;HEMMING, H.; WÄRNGÅRD L.;AHLBORG U.G.. Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1413-1417,1990.

GOLDSWORTHY, T. L.; FRASSON-STEEN, R.; MARONPOT, R.R. Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, p. 24-35, 1996.

GRIMALT, J. O.; SUNYER, J.; MORENO, V. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. **Int. J. Cancer**, v. 56, p. 200-203, 1994

HANAHAN, D.; Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, n. 5, p. 646-74. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal. **Culturas Temporárias e Permanentes 2011**. Rio de Janeiro, v. 38, p.1-97, 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Occupational Exposures in Insecticide Application, and Some Pesticides. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. v. 53, p. 267, 1991.

ISHMAEL J, MACGREGOR JA, MANLEY A. Dichlorvos--a comprehensive review of 11 rodent carcinogenicity studies. **Regulatory toxicology and pharmacology**. v. 44, n. 3, p. 238-48. 2006.

ITO, N. ET AL., Effects of ingesting a combination of 20 or 40 pesticides at ADI levels on carcinogenesis in rats. **Rev. Toxicol.**, v. 2, p. 85-92, 1998

ITO, N. ET AL., Medium-Term Bioassays for Carcinogenicity of Chemical Mixtures. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p. 1131-1136, 1998 b.

Jemal A; Bray F; Center MM; Ferlay J; Ward E; Forman D. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin.** v. 61, n. 2, p. 69-90. 2011.

KAUFMANN, W. K. et al., Proliferation of carcinogen-damaged hepatocytes during cell-cycledependent initiation of hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1587-1593, 1991.

KOUTROS S.; MAHAJAN R.; ZHENG T.; HOPPIN J.A.; MA X.; LYNCH C.F.; BLAIR A.; ALAVANJA M.C. Dichlorvos exposure and human cancer risk: results from the Agricultural Health Study. **Cancer Causes Control**. v. 19, n. 1, p. 59-65. 2008.

KUHN, R. E.; GUZMÁN-SILVA, M. A.; GUIMARÃES, J. S. P. Histogênese e patogênese das neoplasias hepáticas. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 36, p. 49-55, 1990.

Leenders, M.W.; Nijkamp, M.W.; Borel, Rinkes I.H. Mouse models in liver cancer research: a review of current literature. **World J Gastroenterol.**, v. 14, n. 45, p. 6915-23. 2008.

LU, F.C. Acceptable daily intakes: inception, evolution and application. **Reg. Toxicol. Pharmacol.** 8, 45-60, 1988.

LU, F.C. Basic Toxicology Hemisphere Publishing Corporation, New York, pp. 327-344, 1991.

MARONPOT RR, YOSHIZAWA K, NYSKA A, HARADA T, FLAKE G, MUELLER G, SINGH B, WARD JM. Hepatic enzyme induction: histopathology. **Toxicol Pathol.** v.38,n.5,p.776-95. 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT/ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2010-2019**. 2010.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, Suppl., p. 962-970, 1993.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v. 5, 2280-2286, 1991.

RAHMANZADEH, R.; HÜTTMANN, G.; GERDES, J.; SCHOLZEN, T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. **Cell Prolif.** v. 40, n. 3, p. 422-30. 2007.

REEVES, P.G.;NIELSEN FH, FAHEY GC JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v. 123, n. 11, p. 1939-51.1993.

ROUS, P.; KIDD, J. G. Conditional neoplasms and sub-threshold neoplastic states: a study of the tar tumors of rabbits. **J. Exp. Med.**, v. 73, p.181-187, 1941

SCHOLZEN T, GERDES J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol.** v. 182, n. 3, p. 311-22. 2000.

SCHULTE-HERMANN, R. et al., Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. **Mutat. Res.**, v. 333, p. 81-87, 1995.

SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: a historical review of model development and summary of results from 291 tests. **Toxicol. Pathol.**, v. 25, p. 453-60, 1997.

SUK, W, A.; OLDEN, K.; YANG R. S. H. Chemical Mixtures Research: Significance and Future Perspectives. **Environ. Health Perspect.**, v.110, p. 891-892, 2002.

TATEMATSU, M. et al., Placental Glutathione S-Transferase (GST-P) as a new marker for Hepatocarcinogenesis: in vivo short-term screening of hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 15, p. 60-68, 1987.

TSUDA, H. et al., Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, p. 80-86, 2003.

UBOH FE, ASUQUO EN, ETENG MU. EndosulfanEndossulfam-induced hepatotoxicity is route of exposure independent in rats. **Toxicol Ind Health.** V. 27, n. 6, p. 483-8. 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. July 19, 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Permethrin, 1992.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference dose for chronic oral exposure (RfD). Dichlorvos, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Permethrin Facts. Reregistration Eligibility Decision (RED) Fact Sheet. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Endosulfan: Final Product Cancellation Order. Federal Register Volume 75, Number 217. 2010.

VIAU, C. Biological Monitoring of Exposure to Mixtures. **Toxicol. Lett.**, v. 134, n. 1-3, p.916, 2002.

WONG JJ, HSIEH DP. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 73, n. 7, p. 2241-4. 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Data sheets on pesticides: Dicofol. **Geneva: IPCS INCHEM**, 1996. n.81, p. 1-13.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Data sheets on pesticides: EndosulfanEndossulfam. **Geneva: IPCS INCHEM**, 1989. n. 92, p. 1-15.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of some pesticides residues in food: Dieldrin. **Geneva: IPCS INCHEM**, 1970. p.1-32.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues. WHO Tech. Rep. Ser., v. 240, 1962.

WU MC. Clinical research advances in primary liver cancer. **World J Gastroenterol.** v. 4, n. 6, p. 471-74. 1998.

YANG, R. S. Some critical issues and concerns related to research advances on toxicology of chemical mixtures. **Environ. Health. Perspect.**, v. 106, Suppl 4, p. 1059-63, 1998.

ZIEGLER U, GROSCURTH P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci.** v.19, p.124-8.2004.

Anexos

Anexo 1.



Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico

DIFOCOL 950 TÉCNICO AGAN MIL

Página: (1 de 9)

1. IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA

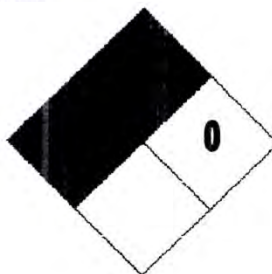
- **Nome do Produto:** Difocol 950 Técnico Agan Mil.
- **Aplicação:** Produto técnico utilizado para formulações acaricidas do grupo dos organoclorados
- **Fabricante:** Agan Chemical Manufacturers Ltd. Agan Chemical Manufacturers Ltd.
P.O. Box 262. Ashdod – Israel. 77.102
- **Fornecedor:** MILENIA AGRO CIÊNCIAS S.A.
Rua Pedro Antônio de Souza, 400 – Londrina – PR.
E-mail: mlenia@mlenia.com.br / <http://www.milenia.com.br>
- **Telefone de emergência:** 0800 – 400 75 05 - Londrina - PR
Fax: (0XX43) 3371-9011

2. COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES

- **Natureza Química:** Este produto químico é uma substância pura.

<u>Nome químico</u>	<u>Nº CAS</u>	<u>Concentração</u>	<u>Fórmula Molecular</u>	<u>Classificação Toxicológica</u>
1,1-bis(clorofenil)- 2,2,2-tricloroetanol	115-32-2	940 g/kg	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	Classe II – Altamente Tóxico

- **Sinônimos:** Dicofol
- **Ingredientes ou impurezas que contribuam para o perigo:** Os demais componentes do produto não são classificados como perigosos.
- **Classificação e rotulagem de perigo:**



Data de elaboração: (02/10/2003)
Número de Revisão: (1)

Data de revisão: (03/11/2003)

Anexo 2.



Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Riedel-de Haën

CERTIFICATE OF ANALYSIS / INSPECTION CERTIFICATE 3.1 acc. to DIN EN 10204

Seelze, 30.01.2007/799773

Order-No.:
Customer-No.:

Order-Code:
:

Quantity:

Production date: 15. Jan. 2007
rec. Retest Date: 15. Jan. 2010

Article/Product: 45441

Batch : 7015X

Dichlorvos PESTANAL®

Reference Material (RM)

1. General Information

Formula: C₄H₇Cl₂O₄P

CAS-No.: [62-73-7]

Usage : Acaricide/Insecticide

Molar mass: 220.98 g/Mole

Recomm. storage temp.: approx. -20 °C

The estimated relative error of a single measurement of the assay can be expected to be $\pm 0.5\%$
(confidence level 95 %, n=6).

2. Batch Analysis

Identity (NMR)

complying

Assay (HPLC)

98.8 area %

Water (Karl Fischer)

0.002 %

Refractive index (n_{25/D})

1.4521

Date of Analysis

29. Jan. 2007

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- The batch from which we delivered, showed the above-mentioned values.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Assurance

(Dr. Gaede)

Works Inspector

Anexo 3.



Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
Telefon: +49 5137 8238-150

Riedel-deHaën

CERTIFICATE OF ANALYSIS / INSPECTION CERTIFICATE 3.1 acc. to DIN EN 10204

Seelze, 02.01.2008/858659/07/07646

Order-No.:
Customer-No.:

Order-Code:

Quantity:

Production Date: 20.Mar.2007
Expiry Date: 20.Mar.2012

Article/Product: 45614

Batch : 7079X

Permethrin (mixture of cis and trans isomers) PESTANAL®

Reference Material (RM)

1. General Information

Formula: C₂₁H₂₀Cl₂O₃
CAS-No.: [52645-53-1]
Usage : Insecticide

Molar mass: 391.29 g/Mole
Recomm. storage temp.: roomtemp.

The estimated relative error of a single measurement of the assay can be expected to be $\pm 1\%$
(confidence level 95 %, n=6).

2. Batch Analysis

Identity (NMR)	complying
ass. of cis/trans-isom. (HPLC)	98.0 %
Assay of cis-isomer (HPLC)	26.4 area %
Assay of trans-isom. (HPLC)	71.7 area %
Date of Analysis	27.Mar.2007

3. Advice and Remarks

- The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.
- Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.
- We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.
- A sample of the above mentioned batch showed the listed analytical values.
- Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.
- We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales.

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH
Quality Assurance

(Dr. Gaede)

Works Inspector

Anexo 4.

Bayer CropScience



Bayer S/A
CNPJ : 18.459.628/0033-00
I.E : 77.375.813
Estrada da Boa Esperanca, 650
26110-110 BELFORD ROXO-RJ
BRASILIE

Bayer CropScience AG
Customer Service Frankfurt
D-65926 Frankfurt am Main

E-Mail: cs.ffm
@bayercropscience.com
Fax: +49 69 305 16365

2008-01-07
Page 1 of 1

Certificate of Analysis

Material
04601202
THIODAN TECNICO 1X25KG BOX WW

Purchase order item/date
225333 / 2007-12-10

Delivery item/date
80740848 000010 / 2008-02-05

Customer number
4240006

Order item/date
533722 000010 / 2007-12-10

Description	Specification	Value	Value	Value
Batch		EGPC700004	EGPC700003	EGPC700009
Delivered quantity		750 kg	4.500 kg	8.250 kg
Production date		2007-01	2007-01	2007-01
Expiry date (temperate climate)		2009-01	2009-01	2009-01
Inspection lot		010001213921	040001206509	040001206926
Endosulfan	96,5 - 100,0 %	98,0 %	97,90 %	98,00 %

The statements made on this certificate must be applied subject to the agreement relating to the production or sale of the above-mentioned product which is not hereby amended in any way.

The above particulars do not release the customer from the obligation to carry out an inspection of goods received.

The production plants of Bayer CropScience are certified according ISO 9001-2000 or comply to a comparable quality management system.

This is an electronically generated certificate and is valid without a signature.

For additional information please refer to the latest specification.

Board of Management: Friedrich Berschauer, Chairman; Rüdiger Scheitza, Dirk Suwelack, Wolfgang Welter
Chairman of the Supervisory Board: Klaus Kühn
Registered office Monheim, Registered at the local court of Düsseldorf, HRB 46985