

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 24/08/2020.



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

Rafaela Marono Fava

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

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

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

**BOTUCATU  
2018**

Rafaela Marono Fava

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

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

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

Botucatu  
2018

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

Marono Fava, Rafaela.

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

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

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

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

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

*Dedicatória*

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

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

*(Chico Xavier)*

# *Agradecimientos*

*À Deus pois sem ele nada existiria.*

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

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

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

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

*Ao meu avô Moacyr por todo amor e dedicação.*

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

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

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

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

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

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

*À Shadia, pelas valiosas considerações para o trabalho.*



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

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

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

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

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

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

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

*Aos amigos do departamento de Patologia pelo carinho e acolhimento.*

*Agradecimentos especiais*

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

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

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

# Sumário

## PARTE I

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

## PARTE II

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

*Parte I*

## RESUMO

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

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

## **REVISÃO DE LITERATURA**

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

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

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

## 11. REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Olfat Shaker, M.D., Olfat Hammam, M.D., Mohamed Wishahi, M.D., Mamdouh Roshdi, M.D., 2013. TGF- $\beta$ 1 pathway as biological marker of bladder carcinoma schistosomal and non-schistosomal. *Urologic Oncology*. 31, 372- 378.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Toxicol. 31, 285-95.

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