
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

*Expressão do gene Glipican 3 (Gpc3) no urotélio da bexiga de
ratos expostos ao diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-
dimethylurea) por 7 dias e 20 semanas*

Lígia Maria Micaí Gomide

Orientador: Prof. Titular Dr. João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadora: Dra. Shadia Muhammad Ihlaseh Catalano

Monografia realizada no Departamento de
Patologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu-SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

CAMPUS DE BOTUCATU

*Expressão do gene Glipican 3 (Gpc3) no urotélio da bexiga de
ratos expostos ao diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-
dimethylurea) por 7 dias e 20 semanas*

Lígia Maria Micai Gomide

Orientador: Prof. Titular Dr. João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadora: Dra. Shadia Muhammad Ihlaseh Catalano

Monografia realizada no Departamento de
Patologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu-SP
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**

Gomide, Lígia Maria Micai.

Expressão do gene Glipican 3 (Gpc3) no urotélio da bexiga de ratos expostos ao diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) por 7 dias e 20 semanas / Lígia Maria Micai Gomide. – Botucatu: [s.n.], 2012

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

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Coorientador: Shadia Muhammad Ihaseh Catalano

Capes: 40105008

1. Bexiga. 2. Genética – Expressão. 3. Carcinogênese. 4. Diuron – Estudos experimentais. 5. Herbicidas. 6. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Bexiga urinária; Carcinogênese; Diuron; Glipican 3.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Fernando e minha mãe Fátima pelo amor incondicional, pelos ensinamentos constantes e pelo exemplo de determinação, força e fé.

*“O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno”*

(William Shakespeare)

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Dr. João Lauro Viana de Camargo, pelos ensinamentos que sempre enriquecem o conhecimento, estimulam o pensamento crítico e ensinam a ver com clareza e pelo seu exemplo de honestidade e dedicação à pesquisa.

A minha co-orientadora, Dra. Shadia Muhammad Ihaseh Catalano, por todo apoio desde o início deste estudo, sempre trazendo conhecimento científico e pelo exemplo de honestidade, respeito e dedicação.

A pesquisadora Dra. Fabíola Rosa Mattos, pelo conhecimento científico que me transmitiu e por todo seu apoio, carinho e dedicação.

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

(William Shakespeare)

Agradecimentos

Muito obrigada Deus, por sempre estar presente em todos os momentos.

Ao meu namorado Wellinton, pelo constante apoio, pelo amor intenso e mais que perfeito, pelo companheirismo, pelas besteiras, pelos momentos de diversão e brincadeiras, por sempre me animar nos momentos mais difíceis, por cuidar muito de mim quando estou com algum problema. Muito obrigada por ser essa pessoa preocupada e amável, sempre olhando por mim.

A minha família, Fernando, Fátima, Fernanda e Roberto, pelo apoio nas horas difíceis, pelo imenso amor, carinho e por sempre me ensinar a seguir em frente e a ter determinação. Pelos momentos de diversão e descontração. Pela felicidade infinita que sinto ao estar com vocês. Muito obrigada por estarem sempre presentes e por serem pacientes, pelos cuidados quando fico doente. Obrigada pelo carinho demonstrado em cada palavra e em cada gesto.

As minhas amigas: Bia, Natacha, Renata e Rebeca pela grande amizade, pelas sugestões, pelas opiniões, pelos momentos filosóficos, pelas broncas, pelas discussões e por sempre tornarem a minha vida mais divertida e feliz.

Aos meus amigos do TOXICAM: Ana Beatriz, Rafaela, Merielen, Gabrielli, Viviane, Ana Paula, Paulo, Nathália Almeida, Nathália Pereira, Mitscheli, Marize, João, Cristina, Carla, Iza, Caroline e Marina, pelo companheirismo e amizade.

As amigas da Patologia Molecular: Ana Paula, Annie, Natacha, Renata, Nathália e Mafalda pela grande ajuda, pela paciência e amizade.

Ao pessoal do laboratório da Dra. Márcia, em especial a Natália, que contribuiu muito para esse trabalho me auxiliando na análise das amostras pelo Bioanalyzer.

Aos funcionários do departamento de Patologia: Cris, Luciano e Marquinhos por colaborar de alguma forma para esse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica (Processo Nº 2011/21701-1) concedida.

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	4
Introdução	7
Objetivos.....	14
1. Objetivo geral	15
2. Objetivo específico	15
Material e Métodos.....	16
1. Delineamento experimental e coleta das células uroteliais.....	17
2. Extração e purificação do RNA	18
3. Quantificação de RNA total	20
4. Integridade e qualidade do RNA.....	20
5. Tratamento com DNase I.....	22
6. Obtenção do cDNA.....	23
7. RT-PCR quantitativo em tempo real.....	23
8. Testes estatísticos.....	25
Resultados	26
1. Quantificação do RNA	27
2. Integridade e qualidade do RNA.....	28
3. RT-PCR quantitativa em tempo real.....	31
3.1. Curva padrão relativa.....	31
3.2. Quantificação relativa (QR).....	32
Discussão.....	39
Referências.....	43

Resumo

O diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) é um herbicida derivado da uréia amplamente usado em culturas de cana, algodão e soja. Em 1997, este agente foi classificado pela United States Environmental Protection Agency como “provável cancerígeno para a espécie humana”, pois induziu tumores na bexiga e pelve renal de ratos, e na pele e mama de camundongos, expostos pela ração a 2500 ppm do produto durante dois anos. Estudo prévio de nosso grupo demonstrou relação dose-resposta no perfil de expressão gênica, associado a focos de necrose grave do urotélio vesical e aumento da incidência de hiperplasia simples em ratos Wistar machos tratados com diferentes concentrações de diuron durante 20 semanas. Para verificar o quão precoce ocorriam as alterações moleculares, ratos foram alimentados durante 7 dias com rações contendo diuron a 0, 125, 500 ou 2.500 ppm. Entre outras observações, foram registradas alterações ultraestruturais da mucosa e comprometimento de vias moleculares associadas à interação célula-célula e à manutenção da organização tecidual. Particularmente, o gene Glipican 3 (Gpc3), um proteoglicano de superfície envolvido na adesão celular e indução de apoptose, apresentou expressão diminuída após 7 dias e 20 semanas de exposição a 2500ppm de diuron.

O objetivo do presente estudo foi validar, por RT-PCR quantitativa em tempo real, a redução de expressão do gene Gpc3 em células epiteliais de bexiga urinária de ratos Wistar machos tratados com diferentes concentrações de diuron durante 7 dias e 20 semanas.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real teve como controle endógeno o gene β -actina e como alvo o gene Gpc3. A quantificação relativa (QR) foi obtida através do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Foi observada diminuição de expressão do gene Gpc3 nos animais expostos ao diuron por 7 dias ou por 20 semanas, em comparação com os não expostos. Essa diminuição apresentou-se significativa apenas no estudo de 7 dias. Além disso, comparando os animais expostos por 7 dias com os expostos por 20 semanas, foi possível identificar relação tempo-resposta. Os animais expostos por 7 dias tiveram maior diminuição da expressão do gene Gpc3 do que aqueles expostos por 20 semanas. Para a maior concentração (2.500 ppm), não houve diferença significativa da expressão de Gpc3 em 7 dias e 20 semanas. Esses resultados reforçam a hipótese de que o gene Gpc3 é um possível supressor da carcinogênese química experimental na bexiga urinária e, como tal, tem papel relevante no modo de ação cancerígeno do diuron sobre o urotélio de ratos.

Abstract

Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) is a substituted urea herbicide widely used in crops of sugar cane, cotton and soybeans. In 1997, this agent has been classified by the United States Environmental Protection Agency as "known/likely human carcinogen" because it induced tumors in the urinary bladder and renal pelvis of rats, and breast and skin of mice exposed to 2500 ppm for feed for two years. A previous study from our group demonstrated dose-response relationship in the gene expression profile associated with severe necrosis on bladder urothelium and increased incidence of simple hyperplasia in male Wistar rats treated with different concentrations of diuron for 20 weeks. To check how early the molecular changes occurs, rats were fed for 7 days with diets containing diuron at 0, 125, 500 or 2500 ppm. The main observations recorded were urothelium ultrastructural alterations and disruptions of molecular pathways associated with cell-cell interaction and the tissue organization maintenance. Particularly, the gene Glypican 3 (Gpc3), a surface proteoglycan related to cellular adhesion and apoptosis induction, was down regulated on urothelium exposed to 2500ppm diuron for 7 days and 20 weeks.

The aim of this study was validate by quantitative RT-PCR real time, the reduced Gpc3 gene expression in epithelial cells of the urinary bladder of male Wistar rats treated with different concentrations of diuron for 7 days and 20 weeks.

The endogenous control of the quantitative PCR real time technique was the β -actin gene and the target was the gene Gpc3. The relative quantification (RQ) was obtained by the method of relative quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Animals exposed to diuron for 7 days or for 20 weeks presented reduction of Gpc3 gene expression compared to the control group. This reduction was

statistically significant only for the 7 days study. Moreover, by comparing animals exposed for 7 days with the exposed for 20 weeks, it was possible to identify time-response relationship. The reduced Gpc3 gene expression was more prominent in the 7 days group than to the 20 weeks. For the highest concentration (2,500 ppm), it was not observed significant difference in the expression of Gpc3 between the 7 days and 20 weeks groups. These results support the hypothesis that the Gpc3 is a possible suppressor of chemical carcinogenesis in experimental urinary bladder and, as such, play a role in the carcinogenic mode of action of diuron on the urothelium of rats.

Introdução

O diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) é um herbicida derivado da uréia amplamente utilizado em culturas agrícolas como soja, cana e algodão (Iyer et al., 2002). Ele inibe o processo de fotossíntese pela formação de espécies reativas de oxigênio, que interferem no transporte de elétrons (Geoffrey et al., 2002). Este agente foi classificado pela United States Environmental Protection Agency em 1997 como “provável cancerígeno para a espécie humana” por ter induzido tumores na bexiga e pelve renal de ratos, e na pele e mama de camundongos, expostos pela ração a 2.500 ppm do produto durante dois anos (USEPA, 2003; USEPA 2004). Em estudo prévio de nosso grupo, foram observados focos de necrose grave no urotélio vesical de ratos Wistar machos tratados com diuron 2.500ppm durante 20 semanas, associados a aumento do índice de proliferação celular e da incidência de hiperplasia simples (Nascimento et al., 2006).

O modo de ação (MOA) cancerígena do diuron na bexiga urinária é provavelmente não-genotóxico (Gee, 1997; Iyer, 2002; USEPA, 2003, Nascimento et al., 2006). Em outro estudo de nosso laboratório foram excluídos como provável MOA do diuron alguns efeitos indiretos, como alteração do pH urinário e a formação de cristais e precipitados, que poderiam levar à necrose esfoliativa e proliferação regenerativa (Rocha et al., 2010). É possível que a ação direta do herbicida e/ou de seus metabólitos cause citotoxicidade e necrose urotelial seguida de hiperplasia regenerativa, o que eventualmente pode levar a formação de tumores em dois anos (Rocha et al., 2010).

Em estudo recentemente publicado por nosso grupo, o perfil global de expressão gênica de células epiteliais de bexiga urinária de ratos tratados com diferentes concentrações de diuron por 20 semanas foi avaliado por DNA

microarray (Ihlaseh et al., 2011). Neste estudo foi verificada relação de dose-resposta tanto no perfil de expressão gênica como na incidência de lesões histológicas. As principais vias moleculares alteradas relacionavam-se ao metabolismo de lipídeos e de aminoácidos, ao metabolismo de xenobióticos e estresse oxidativo, sugerindo envolvimento no processo de toxicidade urotelial seguida por hiperplasia regenerativa (Ihlaseh et al., 2011).

Para verificar possíveis alterações moleculares precoces causadas pelo diuron, um estudo subsequente do nosso grupo avaliou ratos Wistar machos expostos a 0, 125, 500 e 2.500 ppm de diuron na ração durante 7 dias (dados não publicados, Ihlaseh, 2011, tese). O número de genes diferencialmente expressos aumentou conforme as concentrações de diuron. O perfil de expressão gênica indicou que as principais vias moleculares comprometidas relacionavam-se com organização tecidual e conexão célula-célula, crescimento celular e proliferação, câncer, resposta imunológica e metabolismo de ácidos nucléicos. O comprometimento de vias moleculares associadas à interação celular e organização tecidual foi também sugerido morfolologicamente pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), que revelou áreas de perda da adesão célula-célula. A análise da incidência de lesões histológicas e ultraestruturais, no entanto, não revelou diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de diuron.

Para identificar as alterações moleculares precoces em comum com as apresentadas em 20 semanas, foram comparados os perfis de expressão gênica dos dois estudos (7 dias e 20 semanas). A análise do *microarray* apontou mais diferenças do que semelhanças em relação às funções e às vias moleculares que se apresentaram diferencialmente expressas, como descrito acima. Comparando

genes específicos comuns aos dois períodos de exposição, nenhum gene apresentou-se diferencialmente expresso em todas as doses estudadas e nos dois momentos (7 dias: 125, 500 e 2.500 ppm; 20 semanas: 60, 125, 1250 e 2.500 ppm). No entanto, considerando somente a concentração claramente cancerígena (2.500 ppm) houve 134 genes diferencialmente expressos e comuns a ambos os momentos, alguns deles associados ao processo de carcinogênese. Destes genes, 11 foram pré-selecionados visto que apresentaram alta significância (*fold change* (FC) menor que -1,5 ou maior que 1,5), mesma direção de alteração (aumento ou diminuição) de expressão nos dois períodos e relação tempo-resposta positiva. O gene Glipican 3 (Gpc3), um proteoglicano presente na superfície exocitoplasmática da membrana celular por um eixo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), foi selecionado dentre os onze, pois (1) apresentou FC de -4,6 e -6,5 após 7 dias e 20 semanas, respectivamente, indicando alta significância e diminuição de expressão em ambos os períodos estudados, seguindo uma relação temporal de exposição-resposta e, (2) já foi descrito como envolvido com o processo de carcinogênese em diferentes tipos de tumores, como ovário, glândula mamária e mesotélio, e, particularmente, como possível gene supressor tumoral em câncer de pulmão e como modulador da morfogênese (Filmus, 1995; 2001; Li et al., 1997; Pellegrini et al., 1998; Kim et al., 2003).

Os glipicans são necessários para otimizar a atividade de fatores de crescimento ligantes de heparina, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), e participantes das vias *wingless* (Wnts) e de Hedgehog (Hh) (Yayon et al., 1991; Schlessinger et al., 1995; Reichsman et al., 1996; Binari et al., 1997., Desbordes and Sanson, 2003). O gene Gpc3, em especial, está relacionado à proliferação celular e a possibilidade de indução de apoptose em tumores (Duenas

Gonzales et al., 1998; Cano-Gauci et al., 1999). Dados recentes mostram que este gene tem expressão diminuída em tumores de diferentes origens, como em carcinoma de ovário, colangioma, mesotelioma e adenocarcinoma de mama (Lin et al., 1999a; Murthy et al., 2000; Xiang et al., 2001; Man et al., 2005). Porém, foi demonstrado aumento do nível de expressão deste gene em carcinoma hepatocelular humano, tumores embrionários (neuroblastoma, meduloblastoma e tumor de Wilms) e câncer de cólon se comparados com os tecidos normais correspondentes (Hsu et al., 1997; Saikali et al., 2000; Lage et al., 1998; Zhu et al., 2001). Uma possível explicação para essa diferença na expressão do Gpc3 em diferentes tumores é que em alguns tecidos como intestino e fígado este gene se expressa apenas na fase embrionária e se torna silenciado nesses mesmos tecidos adultos normais, o que sugere que nesses órgãos o Gpc3 se comporta como uma proteína oncofetal, podendo reaparecer durante a transformação maligna tumoral. Por outro lado, tecidos adultos que normalmente expressam Gpc3, apresentam esta expressão diminuída em tumores (Filmus et al., 2001). Essa diferença tecido-específica sugere que o Gpc3 está regulando fatores de sobrevivência e crescimento em cada tecido (Filmus et al., 2001).

O Gpc3 é capaz de modular a via Wnt, que está relacionada com proliferação celular e desenvolvimento embrionário, e é responsável pela regeneração de tecidos adultos normais através do controle da função de células tronco em tecidos específicos (Stigliano et al., 2009; Ilyas, 2005; Alonso et al., 2003). Existem duas principais vias Wnt: a via canônica e a via não canônica. Na via canônica ativada, a proteína Wnt se liga ao seu receptor de membrana Frizzled que bloqueia a degradação de β -catenina por um complexo multiprotéico. Subsequentemente, ocorre acúmulo de β -catenina no citoplasma, que se transloca para o núcleo e se

liga aos fatores de transcrição LEF (Lymphoid Enhancer Factor)/TCF(T-Cell Factor), promovendo a expressão de genes alvo que são responsáveis por regular a proliferação celular, o processo de desenvolvimento e a progressão tumoral (Ilyas, 2005). A via não canônica apresenta três subvias: uma via Wnt de polaridade celular planar (PCP) e duas vias Wnt/Ca²⁺ que liberam íons cálcio para o citoplasma (Davis et al., 2008). Na via de sinalização Wnt, o Gpc3 apresenta efeito positivo, facilitando a ligação de Wnt com seu receptor Frizzled, levando ao aumento da sinalização para induzir a proliferação celular (Filmus et al., 2008).

Além da via Wnt, o Gpc3 também é capaz de regular a via de sinalização Hedgehog (Hh). A ligação do Hh com seu receptor transmembrana Patched resulta na ativação de uma proteína transmembrana Smoothened, que transduz o sinal de Hh para o citoplasma e leva a ativação de fatores de transcrição da família Gli e a expressão de genes alvo de Hh (Capurro et al., 2008; Hooper and Scott, 2005). Foi observado que o Gpc3 atua como regulador negativo do crescimento corporal por inibir a sinalização Hh durante o desenvolvimento, pela competição com Patched pelo Hh (Capurro et al., 2008).

Em tecidos em que a proliferação celular está sob o controle predominante da via de sinalização Hh, o aumento da expressão de Gpc3 teria um efeito inibitório sobre este processo. Já em tecidos onde a via Wnt canônica exerce influência dominante na regulação da proliferação celular, o aumento da expressão de Gpc3 estimulará a proliferação celular (Filmus et al., 2008). Assim, nas células malignas em que a via Wnt canônica é essencial na estimulação da progressão, como na maioria dos carcinomas hepatocelulares, o aumento da expressão de Gpc3 promoverá crescimento tumoral. De forma alternativa, a perda da expressão de Gpc3 pode levar a progressão dos cânceres cujo crescimento é

predominantemente controlado pela via de sinalização Hh (Filmus et al., 2008). A partir desses dados é importante observar que o padrão de expressão de Gpc3 em cada tecido é altamente específico. É possível que ele possa modular alguma das vias do processo de carcinogênese urotelial.

De interesse, foi observada diminuição de expressão gênica de Gpc3 em câncer de bexiga urinária em ratas fêmeas Fisher que tiveram células de câncer de bexiga implantadas em modelo ortotópico em comparação com a expressão normal nesse mesmo tecido (Arum et al., 2010). Além disso, a expressão protéica do Gpc3 foi negativa em amostras de bexiga urinária humana normal analisada pela técnica de *tissue microarray* (TMA). Em carcinoma invasivo de células transicionais, esta expressão foi negativa em 16% (7/43) dos casos, i.e., 84% deles apresentaram expressão positiva da proteína Gpc3 (Baumhoer et al., 2008). Assim, há indicações de que este gene está de algum modo envolvido na carcinogênese urotelial.

Objetivos

1. Objetivo geral

Contribuir para elucidar o modo de ação cancerígeno do diuron no urotélio do rato, ampliando os conhecimentos sobre possíveis vias moleculares alteradas por esse herbicida.

2. Objetivo específico

Verificar por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) a expressão do gene *Gpc3* em células uroteliais de bexiga urinária de ratos Wistar machos expostos via ração a diferentes concentrações de diuron após 7 dias e 20 semanas.

Material e Métodos

1. Delineamento experimental e coleta das células uroteliais

As amostras de células uroteliais foram obtidas de dois estudos independentes realizados por nosso grupo, nos quais ratos Wistar machos foram expostos via ração a diferentes concentrações de diuron por 7 dias (125, 500 e 2500 ppm) ou por 20 semanas (60, 125, 1.250 e 2.500 ppm). Para a extração de RNA e análise de expressão do gene *Gpc3* por qRT-PCR foram utilizadas células uroteliais de 5 animais por grupo provenientes do estudo de 7 dias (Figura 1A). Para o estudo de 20 semanas foram utilizados de 3 a 5 animais por grupo, sendo que os ratos tratados com diuron foram alocados a grupos de baixa (60 e 125 ppm) e de alta exposição (1250 e 2500 ppm) (Figura 1B). Esta estratificação foi necessária devido ao (1) número reduzido de amostras disponíveis por grupo, visto que o experimento já fora encerrado e, (2) a similaridade do perfil de expressão gênica demonstrado pelo ensaio de *microarray* que permitiu reagrupar os tratamentos em baixa e alta dose, sem perda do significado biológico (Ihlaseh et al., 2011).

A remoção das bexigas urinárias foi realizada enquanto os animais ainda estavam sob efeito profundo da anestesia, indicado pela ausência do reflexo pedal. As etapas de remoção da bexiga para isolar RNA total foram feitas rapidamente e sem interrupção para minimizar autólise (Cohen et al., 2007). O urotélio foi removido da membrana basal conforme descrito (Ihlaseh et al., 2011). As células epiteliais foram armazenadas em Trizol, em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total.

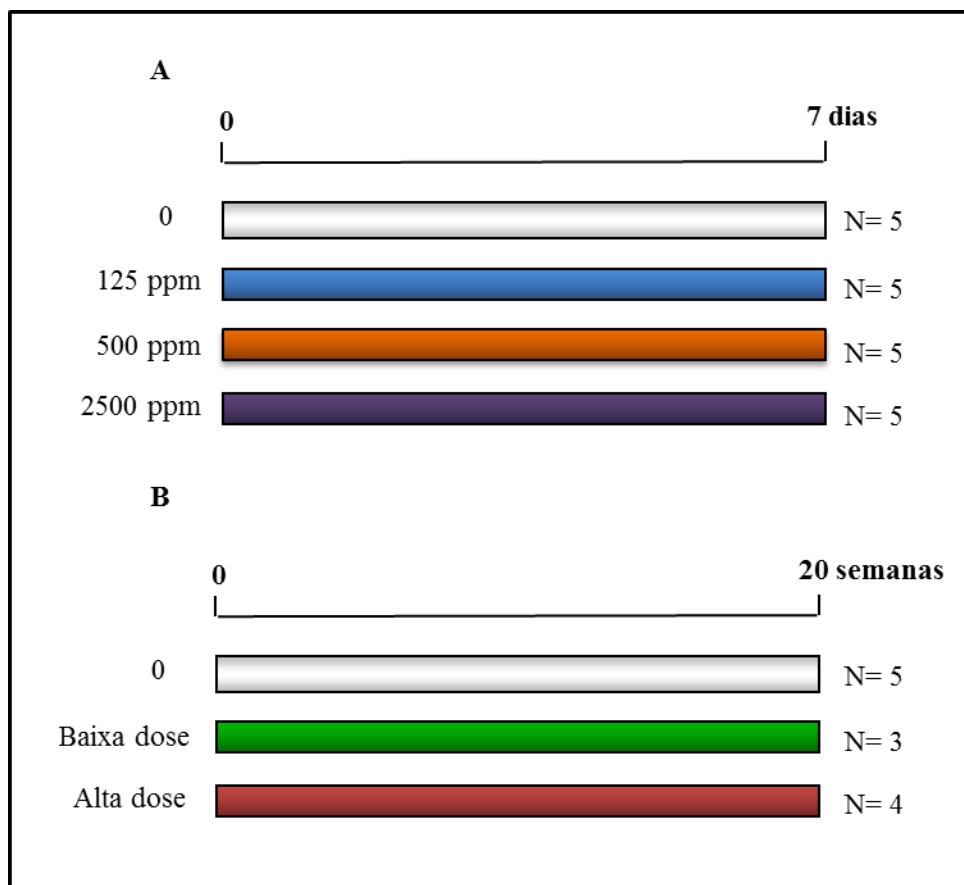


Figura 1. Delineamentos experimentais. Os animais foram expostos ao diuron acrescido na ração nas concentrações indicadas durante A) 7 dias e B) 20 semanas. Grupo de baixa dose: 60 e 125 ppm; Grupo de alta dose: 1250 e 2500 ppm.

2. Extração e purificação do RNA

O RNA total das amostras de células uroteliais da bexiga urinária dos ratos expostos ao diuron por 7 dias (0, 125, 500 ou 2.500 ppm) e 20 semanas (0, 60, 125, 1.250 ou 2.500 ppm) foi extraído pelo método de Trizol (adaptado de Sen et al., 2005). Amostras mantidas em Trizol foram retiradas de temperatura ultrabaixa (-80°C) para temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (200µL), agente responsável pela separação das fases aquosa e orgânica, que contém o RNA e o DNA, respectivamente. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas (Sigma, modelo 1-15PK) a

4°C durante 15 minutos a 13200 rpm, para separação total das fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Para precipitação do RNA, foi adicionado isopropanol (500µL); as amostras foram homogeneizadas e novamente centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 13200 rpm. O sobrenadante foi removido e descartado; foi adicionado álcool 75% (1mL) e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 11400 rpm. O sobrenadante mais uma vez foi descartado e o *pellet* de RNA ficou por 5 a 10 minutos secando ao ar. Em seguida, o RNA total foi ressuspensionado em 100µL de água livre de RNase. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 15 minutos para ressuspender completamente a amostra, que seguiu para purificação do RNA.

A purificação foi realizada com o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, cat. #74104). Inicialmente, foram adicionados 350µL do tampão RLT. Esta etapa da purificação e as próximas foram seguidas por homogeneização com auxílio da micropipeta. Foram adicionados 250µL de álcool 100% e os 700µL resultantes da soma dos 3 reagentes (água livre de RNase, tampão RLT e álcool 100%). O volume foi transferido para a coluna RNeasy Mini Spin contida no tubo coletor de 2 mL. Em seguida, foi realizada centrifugação por 15 segundos a 14000 rpm em temperatura ambiente. A coluna foi transferida para novo tubo, foram adicionados 500µL do tampão RPE e as amostras foram novamente centrifugadas por 15 segundos a 14000 rpm em temperatura ambiente. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo e outros 500µL do tampão RPE foi adicionado na coluna que em seguida foi centrifugada por 2 min a 14000 rpm em temperatura ambiente. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna foi novamente centrifugada por mais um minuto a 14000 rpm em temperatura

ambiente para secar a coluna. A coluna foi transferida para novo tubo e 30µL de água livre de RNase foram adicionados direto no centro da membrana de sílica-gel. A amostra foi centrifugada por um minuto a velocidade de 14000 rpm na temperatura ambiente para eluir o RNA. O RNA isolado foi mantido em -80°C até o momento do uso.

3. Quantificação de RNA total

A concentração de RNA total na amostra (ng/µL) foi avaliada por espectrofotômetro (Epoch, Bio-Tek). Para a quantificação, foi utilizada alíquota de 2µL da amostra. A mesma quantidade de água livre de RNase foi usada como padrão (por ter sido a substância utilizada para ressuspender o RNA). A leitura foi feita medindo os picos de absorbância do RNA e de proteínas, nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, respectivamente. A razão 260/280 de aproximadamente 2 indica pureza do RNA da amostra.

4. Integridade e qualidade do RNA

Para avaliar a integridade do RNA foi utilizado o kit RNA 6000 Pico (Agilent), conforme recomendações do fabricante. Primeiramente, 0,5µL de todas as amostras de RNA total (exceto as amostras com quantidade de RNA inferior a 100ng/µL, quando foi utilizado 1µL) foram diluídos com água estéril (miliQ autoclavada) até a concentração de 5 ng/µL. As amostras diluídas foram denaturadas a 70°C por dois minutos em termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf) e mantidas em gelo.

A integridade do RNA na amostra foi avaliada usando o equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies), após as etapas de preparo do gel, preparo do Mix Gel Dye e preparo do Chip como descrito abaixo:

Preparo do gel: Foram adicionados 70µL do reagente RNA 6000 Pico Gel matrix em tubo com filtro (*spin filters*) proveniente do kit, o qual foi centrifugado a 5200 rpm por 10 minutos (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Após centrifugação, 65µL do gel filtrado foi aliquotado em tubo de 0,5mL e mantidos em 4°C por até um mês.

Preparo do Mix Gel-dye: O reagente RNA 6000 Pico Dye Concentrate foi homogeneizado em vortex por 10 segundos, seguido de centrifugação rápida; 1µL desse reagente foi adicionado aos 65µL do gel filtrado. Novamente, a solução foi homogeneizada usando vórtex e centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos.

Preparo do chip: Para o preparo do chip foi utilizado o Chip Priming Station (que acompanha o Bioanalyzer – Agilent Technologies). Uma seringa foi encaixada na tampa da estação do Chip Priming Station e o chip RNA 6000 Pico foi colocado na estação (posição C). Foram adicionados 9µL do Mix Gel Dye no orifício indicado por “G” do chip. Com a seringa na graduação 1mL, a tampa do Chip Priming Station foi fechada e a seringa pressionada até o fecho que a segura. Após 30 segundos o fecho foi liberado. Foram adicionados mais 9µL do Mix Gel Dye nos outros dois orifícios “G” (indicados no chip). Outros 9µL de RNA 6000 Pico Conditioning Solution foram pipetados na marca “CS” (também indicada no chip).

Em seguida, 5µL de RNA 6000 Pico Marker foram adicionados em todos os orifícios no chip designados para as amostras e para o marcador. Foi pipetado 1µL do marcador RNA 6000 Pico Ladder (armazenado em -80°C) na área indicada no chip como marcador. A seguir, 1µL de cada amostra previamente preparada foi

adicionado em um dos 12 poços designado para as amostras. O chip foi homogeneizado em vórtex por 1 minuto a 2400 rpm e em seguida transferido para análise no Bioanalyzer em aproximadamente 5 minutos.

Após leitura, o Bioanalyzer fornece a concentração do RNA (pg/ μ L), determina as bandas 18S e 28S do RNA e calcula a razão 28/18S e o Número de Integridade do RNA (RIN). Este equipamento fornece imagem da eletroforese e eletroforetograma das amostras, evidenciando bandas (eletroforese) e picos formados pela fluorescência emitida (eletroforetograma) de 18S e 28S, correspondentes às unidades ribossomais do RNA. Quando a eletroforese apresenta só as duas bandas correspondentes às unidades ribossomais 18S e 28S do RNA, sem presença de bandas inespecíficas, pode ser assumido boa integridade do RNA. Em correspondência, o eletroforetograma, construído a partir de fluorescência emitida por segundo apresenta dois picos bem definidos, sem fluorescência de background. A razão 28/18S de aproximadamente 2 indica boa qualidade do RNA. O RIN pode variar de zero a dez, sendo que quanto maior o RIN, melhor a qualidade da amostra.

5. Tratamento com DNase I

O RNA foi tratado com a enzima DNase I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen). Uma quantidade correspondente a 1 μ g de RNA da amostra foi adicionado em tubo de 0,5 mL, no gelo, com 1 μ L do tampão (10X DNase I Reaction Buffer), 1 μ L da enzima (DNase I, Amp Grade – 1U/ μ L) e água livre de RNase e DNase autoclavada até completar 10 μ L de reação. O tubo foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente para a enzima agir. Em seguida, para inativar a enzima, 1 μ L de EDTA (25mM) foi adicionado na reação e o tubo foi

colocado em banho seco Labnet (AccuBlock Digital dry bath) por 10 minutos a 65°C. Após esse procedimento a amostra foi submetida à transcrição reversa.

6. Obtenção do cDNA

O cDNA foi obtido com uso do kit SuperScript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). Todos os reagentes do kit foram centrifugados antes do uso. Em um tubo de 0,2 mL, no gelo, foram adicionados 5,5 µL da amostra de RNA tratada com DNase I (o que corresponde a 0,5 µg do RNA), 1 µL de tampão (Annealing Buffer), 1 µL de nucleotídeos de sequência curta de deoxi-Timina (oligo(dT)20 (50µM)), e, água livre de RNase e DNase até completar 8 µL de reação. Depois, a amostra foi incubada em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf) a 65°C por 5 minutos e imediatamente após essa etapa, colocada no gelo por um minuto. Uma breve centrifugação das amostras foi realizada e a seguir foram adicionados 10 µL do mix de reação (2X First-Strand Reaction Mix contendo 10mM MgCl₂ e 1 mM de cada dNTP) e 2 µL de outro mix contendo a SuperScript III e a enzima RNaseOUT(SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas brevemente. Depois, foram incubadas por 50 minutos a 50°C e seguidamente por 5 minutos a 85°C em termociclador (Mastercycler gradiente, Eppendorf).

7. RT-PCR quantitativo em tempo real

Todas as reações de PCR quantitativo em tempo real foram feitas em aparelho Step One Plus, Applied Biosystems. A análise de expressão do gene Gpc3 e do controle endógeno, gene β -actina, foi realizada pelo sistema Taqman Gene

Expression Assay, da Life Technologies, que utiliza sondas marcadas com fluorescência (Gpc3 - catálogo nº 4331182 ; e β -actina - nº 4352340E). Para a amplificação foi utilizado o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems - catálogo nº 4304437), que contém todos os reagentes necessários para o ensaio. Todas as reações foram feitas em duplicatas.

Primeiramente, foi feita curva padrão relativa para verificar a eficiência da amplificação dos primers. A curva consistiu de diluições seriadas 1:5 de um *pool* de amostras de cDNA (um subgrupo de 13 amostras dentre as utilizadas no experimento) em 5 ordens de magnitude: 1000, 200, 40, 8 e 1,6. As reações foram realizadas em *singleplex*. Tanto para o gene endógeno, como para o gene alvo foram utilizados 0,75 μ L do primer Taqman, 7,5 μ L do Taqman Universal PCR MarterMix, 1,75 μ L de água livre de RNase e DNase e 5 μ L de cDNA de cada amostra, totalizando 15 μ L de reação por amostra. A eficiência foi calculada pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}} - 1$.

Posteriormente, foi realizada a análise da expressão gênica das 7 e 15 amostras de urotélio expostas ao diuron por 20 semanas e 7 dias, respectivamente. Para ambos os experimentos (20 semanas e 7 dias) foram utilizadas 6 amostras de animais não expostos ao diuron como controle negativo. As reações foram feitas com a mesma quantidade de reagentes descrito acima para curva padrão, porém, a quantidade de cDNA de cada amostra foi de 2,5 μ L e a de água foi 4,25 μ L.

A amplificação apresentou duas etapas: uma etapa inicial de 95°C por 10 minutos para denaturar todo o cDNA, e uma outra etapa composta de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura que promove denaturação do cDNA, e 60°C por um minuto, para hibridação dos primers e amplificação do fragmento.

O método utilizado para análise da expressão gênica foi o método de quantificação relativa $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen, 2001), onde o valor de Ct (*Cycle Threshold*) é determinado para cada amostra durante a etapa exponencial de amplificação.

Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene de interesse e o gene referência.

Para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene alvo, da média das duplicatas dos valores de Ct do gene endógeno. Posteriormente, para determinar o $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído do valor da média de ΔCt das amostras controle (sem exposição ao diuron). Este último valor foi adicionado a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ e para cada amostra a quantidade relativa (QR) de transcrito (N vezes > ou < que o grupo controle) foi determinada. Os valores de referência para diminuição de expressão são representados por $QR < 0,5$ e aumento de expressão por $QR > 2,0$.

8. Testes estatísticos

Os testes não paramétricos realizados tiveram como objetivo avaliar a relevância da expressão de Gpc3 das amostras de urotélio expostas ao diuron, observando se havia relação dose-resposta, tempo-resposta e mesmo sentido de alteração (aumento ou diminuição). O teste t de Mann-Whitney foi utilizado para comparar controles e expostos, os tempos de exposição e para grupos sob alta e baixa doses no experimento de 20 semanas. O teste *one way* ANOVA (teste de Kruskal-Wallis) foi feito para comparar as diferenças entre as doses para o grupo exposto por 7 dias. Para todas as análises, os cálculos foram realizados utilizando-se o GraphPad Prism (versão 6.0) e o nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

1. Quantificação do RNA

Todas as amostras apresentaram valor da razão 260/280 entre 2,1 e 2,2, indicando pureza do RNA e seguiram para análise da integridade de RNA (Tabelas 1 e 2). Cinco amostras do grupo exposto por 7 dias apresentaram quantidade abaixo do valor de referência de 100ng/ μ L.

Tabela 1. Quantificação de RNA nas amostras de urotélio de animais expostos ao diuron por 7 dias.

Grupo	Amostra	260nm	280nm	260/280	Concentração (ng/ μ L)
Controle	7*09	0,117	0,055	2,1	93,8
	7*41	1,177	0,554	2,1	941,8
	7*42	0,371	0,176	2,1	296,7
	7*43	0,997	0,468	2,1	797,6
	7*44	0,161	0,075	2,2	128,7
	7*45	0,096	0,046	2,1	76,4
125 ppm	7*16	0,976	0,459	2,1	781,1
	7*46	1,094	0,511	2,1	875,2
	7*47	0,744	0,349	2,1	595,2
	7*48	0,759	0,358	2,1	606,9
	7*49	1,381	0,647	2,1	1104,6
	7*50	1,204	0,566	2,1	962,9
500 ppm	7*26	0,093	0,044	2,1	74,1
	7*27	0,152	0,069	2,2	121,3
	7*28	0,134	0,063	2,1	106,9
	7*51	0,158	0,075	2,1	126,4
	7*52	0,907	0,426	2,1	725,2
500 ppm	7*32	0,05	0,024	2,1	40,1
	7*56	0,065	0,03	2,2	52,0
	7*57	1,197	0,563	2,1	957,6
	7*58	0,594	0,278	2,1	475,2
	7*59	1,399	0,654	2,1	1119,3
	7*60	1,192	0,561	2,1	953,9

* Os dados em vermelho representam concentrações de RNA que ficaram abaixo de 100ng/ μ L.

Tabela 2. Quantificação de RNA nas amostras de urotélio de animais expostos ao diuron por 20 semanas.

Grupo	Amostra	260nm	280nm	260/280	Concentração (ng/μL)
Controle	20*21	0,989	0,465	2,1	791,1
	20*23	0,7	0,325	2,2	559,7
	20*25	0,685	0,323	2,1	548,4
	20*26	1,1	0,518	2,1	880,0
	20*27	1,268	0,593	2,1	1014,7
	20*28	1,01	0,473	2,1	807,8
60 ppm	20*4	1,177	0,551	2,1	941,3
125ppm	20*7	0,405	0,193	2,1	324,1
	20*10	0,935	0,44	2,1	748,1
1250 ppm	20*12	1,277	0,597	2,1	1021,5
	20*13	0,708	0,333	2,1	566,7
2500 ppm	20*17	1,208	0,569	2,1	966,8
	20*19	0,84	0,396	2,1	671,6

2. Integridade e qualidade do RNA

Todas as amostras exibiram as bandas 18S e 28S e os picos correspondentes, exceto três amostras (26, 32 e 44) do grupo de exposição de 7 dias (Figuras 1 e 2). As amostras apresentaram número de integridade de RNA (RIN) entre 5,1 e 8,8, com exceção de duas amostras (32 e 44) que apresentaram baixa integridade do RNA (Tabelas 3 e 4). As amostras 26 e 32 do grupo exposto ao diuron por 7 dias foram excluídas das etapas seguintes por apresentarem baixa quantidade (74,1 e 40,1 ng/μL, respectivamente) e qualidade do RNA (RIN: 5,1 e 2,3, respectivamente). A amostra 44 não foi excluída por conter quantidade suficiente de RNA (128,7 ng/ μL).

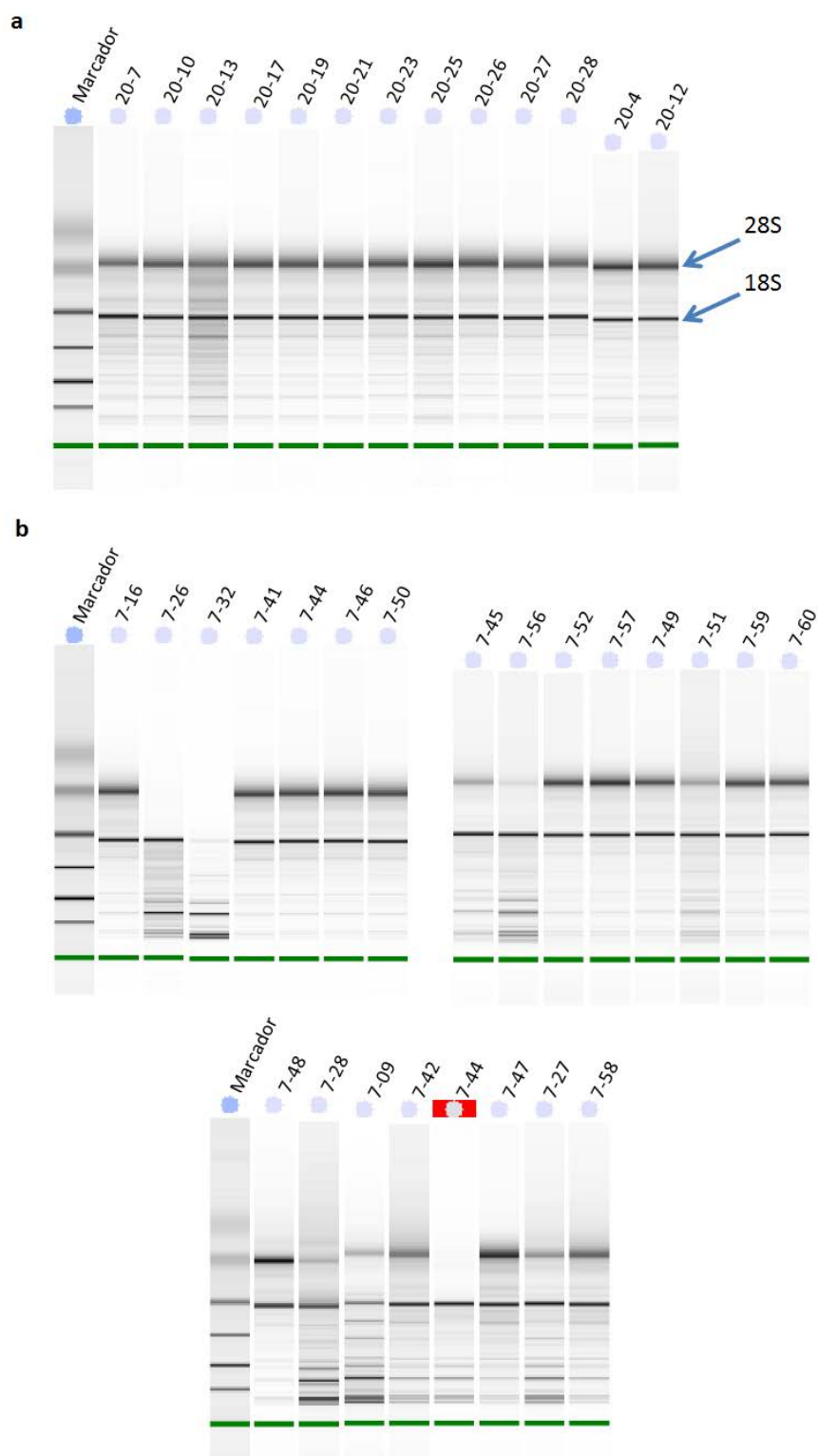


Figura 1. Imagem de eletroforese do RNA contruída pelo Bioanalyzer de amostras dos grupos expostos ao diuron (a) por 20 semanas e (b) por 7 dias. A maioria das amostras apresentou as bandas 18S e 28S (setas) e presença pequena de bandas inespecíficas. As amostras 26, 32 e 44 do período de 7 dias apresentaram apenas a banda 18S, indicando RNA de baixa integridade.

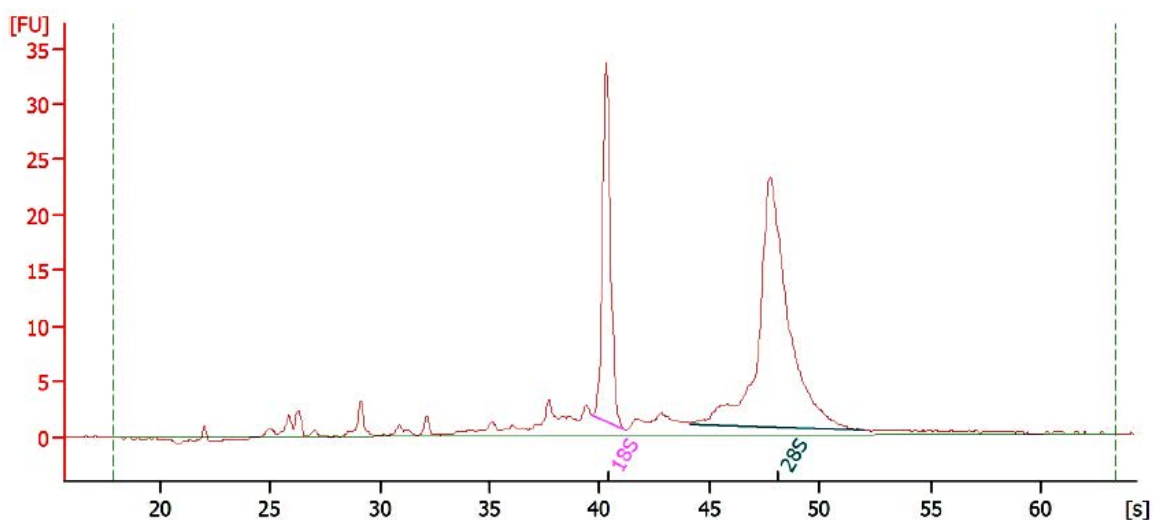


Figura 2. Eletroforetograma - 7 dias de exposição: Os dois picos correspondem a fluorescência emitida pelas unidades ribossomais, 18S e 28S, respectivamente. Os picos bem definidos e a ausência de sinal de background indicam boa integridade do RNA.

Tabela 3. Análise da qualidade do RNA para as amostras de urotélio de animais expostos por 7 dias ao diuron.

Grupo	Amostra	RIN ¹	Concentração (pg/uL)	28/18S
Controle	7*09	5,9	8,05	1,5
	7*41	8,3	4,19	2,4
	7*42	7,4	3,53	1,8
	7*43	8,4	4,86	2,4
	7*44	N/A*	6,32	0,0
	7*45	6,8	12,95	0,7
125 ppm	7*16	8,2	5,13	2,1
	7*46	8,5	3,84	2,3
	7*47	7,6	6,71	2,9
	7*48	8,5	6,73	1,5
	7*49	8,3	8,13	1,9
	7*50	8,5	4,72	2,4
500 ppm	7*26	5,1	4,66	0,0
	7*27	6,6	5,92	0,8
	7*28	6,2	4,65	0,3
	7*51	6,5	4,51	0,6
	7*52	8,8	5,37	2,0
2500 ppm	7*32	2,3	4,95	0,0
	7*56	5,9	9,17	0,2
	7*57	8,7	7,7	2,3
	7*58	7,4	6,75	2,1
	7*59	8,5	6,78	2,1
	7*60	8,8	9,33	2,1

* N/A: não analisado, não foi possível calcular o RIN para esta amostra.

¹RIN: Número de integridade do RNA, i.e., amostras com RIN>5,5 foram consideradas de boa qualidade para prosseguir para qRT-PCR.

Tabela 4. Análise da qualidade do RNA para as amostras de urotélio de animais expostos por 20 semanas ao diuron.

Grupo	Amostra	RIN ¹	Concentração (pg/uL)	28/18S
Controle	20*21	8,3	8,38	2,2
	20*23	8,1	7,34	2,3
	20*25	7,7	8,04	2,8
	20*26	8,4	7,74	2,6
	20*27	8,3	7,48	2,4
	20*28	8,5	6,49	2,3
60 ppm	20*4	8,1	10,07	1,8
125ppm	20*7	6,9	7,05	1,3
	20*10	7,4	6,32	1,7
1250 ppm	20*12	7,9	6,99	1,9
	20*13	5,9	7,21	1,3
2500 ppm	20*17	8,0	5,31	1,8
	20*19	8,4	7,07	2,4

¹RIN: Número de integridade do RNA.

3. RT-PCR quantitativa em tempo real

3.1. Curva padrão relativa

A curva padrão relativa apresentou eficiência de amplificação superior a 80% para os dois genes, Gpc3 e o controle endógeno β -actina. O gráfico de amplificação da curva padrão relativa mostra a amplificação das amostras diluídas em série (Figura 3).

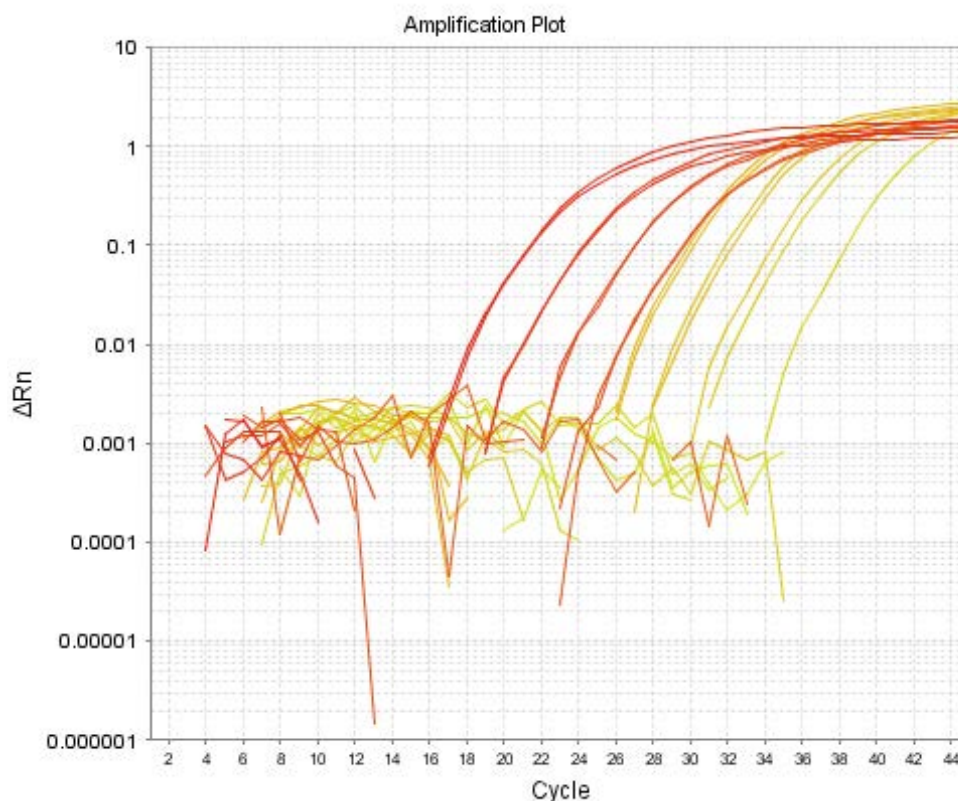


Figura 3. Gráfico de amplificação mostrando a curva padrão relativa de um *pool* de amostras de cDNA diluídas em série (diluição 1:5) para o cálculo da eficiência de amplificação dos primers. As curvas em vermelho representam β -actina e as curvas na cor ocre representam o Gpc3. Gráfico apresentado em número de ciclos (Cycles: 1 a 45) por intensidade de sinal (Rn).

3.2. Quantificação relativa (QR)

Considerando todos os resultados obtidos, é importante ressaltar que a qualidade das técnicas utilizadas (desde a extração do RNA até a qRT-PCR) é mais que satisfatória, permitindo assumir os resultados como confiáveis.

As amostras de urotélio expostas ao diuron foram comparadas com os respectivos controles para ambos os momentos, 7 dias e 20 semanas. Os resultados da quantificação relativa para ambos os períodos (Tabelas 5 e 6) apontaram expressão aumentada ou diminuída do gene Gpc3. Os intervalos de QR para os grupos controles foram de 0,49 à 2,38 e de 0,45 à 2,08, para 7 dias e 20 semanas respectivamente.

Tabela 5. Quantificação relativa do gene Gpc3 pelo método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para as amostras de urotélio exposto ao diuron por 7 dias.

Grupo	Amostra ¹	Média do Ct Gpc3	Média do Ct β -actina	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Quantificação relativa (QR)
Controle	7*09	30,69	21,48	9,21	-1,05	2,08
	7*09	30,87	21,59	9,28	-0,98	1,97
	7*41	29,13	19,50	9,63	-0,63	1,55
	7*41	29,75	19,84	9,91	-0,35	1,28
	7*42	31,28	19,86	11,42	1,15	0,45
	7*42	31,53	20,32	11,21	0,94	0,52
	7*43	29,20	18,75	10,45	0,19	0,88
	7*43	30,72	19,42	11,30	1,04	0,49
	7*44	30,05	19,31	10,73	0,47	0,72
	7*44	30,31	20,72	9,58	-0,68	1,60
	7*45	29,76	19,59	10,17	-0,10	1,07
	7*45	30,19	19,83	10,36	0,10	0,93
	Média	30,30	20,04	10,26	0,00	1,00
125 ppm	7*16	30,06	18,60	11,46	1,19	0,44
	7*46	29,89	18,79	11,09	0,83	0,56
	7*47	30,95	19,79	11,17	0,90	0,53
	7*48	29,64	19,67	9,97	-0,30	1,23
	7*49	31,48	19,73	11,74	1,48	0,36
	7*50	30,46	18,73	11,73	1,46	0,36
500 ppm	7*27	27,52	18,28	9,24	-1,03	2,04
	7*28	31,09	18,70	12,39	2,13	0,23
	7*51	30,51	19,41	11,10	0,84	0,56
	7*52	30,51	18,16	12,35	2,08	0,24
2500 ppm	7*56	31,69	19,26	12,43	2,17	0,22
	7*57	28,50	18,62	9,88	-0,38	1,30
	7*58	29,92	19,27	10,66	0,39	0,76
	7*59	30,26	19,21	11,05	0,78	0,58
	7*60	30,51	18,78	11,73	1,47	0,36

Expressão diminuída: QR<0,5; Expressão aumentada: QR>2,0; Em negrito: amostras com diminuição de expressão. Ct=Cycle threshold.

¹Para este período de exposição, as amostras controle foram repetidas, por isso cada amostra controle aparece duas vezes na tabela.

Tabela 6. Quantificação relativa do gene Gpc3 pelo método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para as amostras de urotélio exposto ao diuron por 20 semanas.

Grupo	Amostra ¹	Média do Ct Gpc3	Média do Ct β -actina	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Quantificação relativa (QR)
Controle	20*21	31,68	20,04	11,64	0,41	0,75
	20*21	32,22	19,95	12,26	1,04	0,49
	20*23	31,80	20,62	11,18	-0,04	1,03
	20*25	28,60	18,63	9,97	-1,25	2,38
	20*25	29,66	18,96	10,70	-0,52	1,44
	20*26	30,50	20,31	10,20	-1,03	2,04
	20*26	31,64	20,93	10,71	-0,51	1,43
	20*27	31,46	19,29	12,17	0,95	0,52
	20*27	31,88	19,72	12,15	0,93	0,52
	20*28	30,96	19,71	11,26	0,03	0,98
	20*28	31,35	19,78	11,56	0,34	0,79
Média		31,04	19,82	11,22	0,00	1,00
Baixa dose	20*4	30,27	19,99	10,27	-0,95	1,93
	20*7	36,18	26,51	9,67	-1,56	2,94
	20*10	30,41	19,97	10,44	-0,79	1,73
Alta dose	20*12	28,54	18,93	9,61	-1,61	3,06
	20*13	32,95	20,66	12,29	1,07	0,48
	20*17	33,32	20,24	13,08	1,85	0,28
	20*19	28,63	18,88	9,74	-1,48	2,79

Expressão diminuída: QR<0,5; Expressão aumentada: QR>2,0; Em negrito: amostras com diminuição de expressão. Ct=Cycle threshold.

¹Para este período de exposição, as amostras controle foram repetidas, por isso cada amostra controle aparece duas vezes na tabela (exceção: 20-23).

Durante o período de exposição de 7 dias, foi observada diferença significativa na expressão de Gpc3 entre os animais controles e os expostos (P=0,0178). O mesmo não foi observado para a exposição por 20 semanas, em que os testes estatísticos demonstraram diferença não significativa (P=0,2753) (Figura 4A e 4C).

No grupo de animais expostos por 20 semanas, não foi observada diferença significativa entre as baixas e altas doses (P=0,8571) (Figura 4B). Três amostras apresentaram expressão de Gpc3 aumentada, uma em animal exposto a baixa dose (amostra 20-7; QR=2,94) e outras duas nos expostos a altas doses (amostras 20-12

e 20-19, QR=3,06 e 2,79, respectivamente). Também houve diminuição da expressão de Gpc3 em animais submetidos a altas doses (Tabela 6).

No grupo de animais expostos por 7 dias houve diminuição de expressão de Gpc3 na maioria dos animais expostos (Tabela 5). Porém, não pode ser observado relação dose-resposta ($P=0,9259$), pois até mesmo na menor dose (125 ppm), foi observada diminuição da expressão de Gpc3 (Figura 4D). Dentro do grupo de animais expostos ao diuron por 7 dias na dose de 500 ppm houve um animal que apresentou aumento de expressão de Gpc3 (amostra 7-27, QR= 2,04).

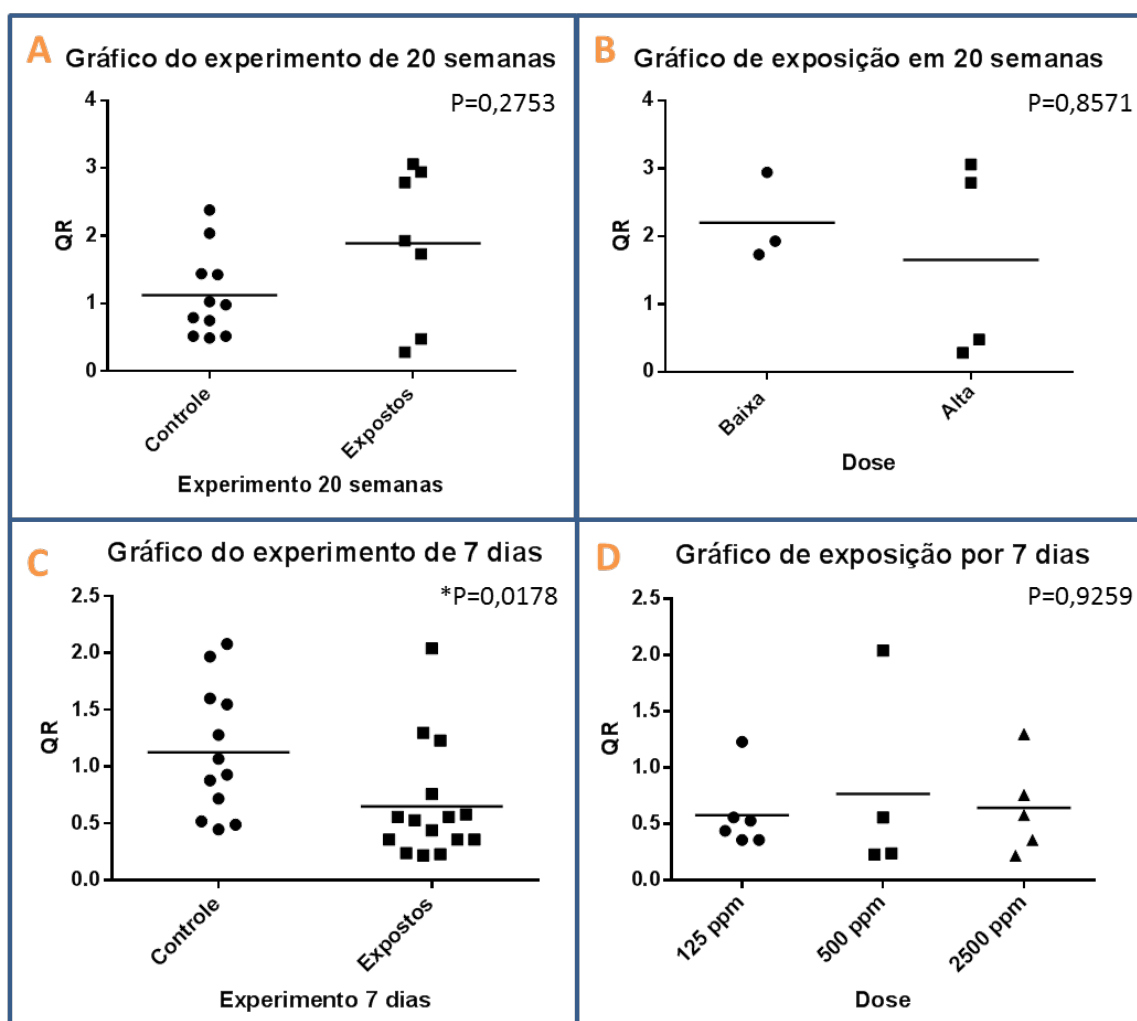


Figura 4. Quantificação relativa (QR) do gene Gpc3. O gráfico **A** mostra a diferença entre o número de controles e os animais expostos por 20 semanas. No gráfico **B**, foi feita comparação entre baixas doses (60 ppm e 125 ppm) e as altas doses (1250

ppm e 2500 ppm) do estudo de 20 semanas. Em **C** mostrou-se a diferença entre o número de controles e os animais expostos por 7 dias. E, no gráfico **D**, foi feita comparação entre as doses administradas (125 ppm, 500 ppm e 2.500 ppm) no estudo de 7 dias.

Foi observada diferença significativa entre a expressão de Gpc3 dos animais expostos ao diuron por 7 dias com a dos expostos por 20 semanas ($P=0,0304$). No período de exposição de 7 dias, a expressão de Gpc3 foi menor que no período de exposição de 20 semanas (Figura 5A). Porém, para a maior dose, não houve diferença significativa entre os tempos de exposição (Figura 5B).

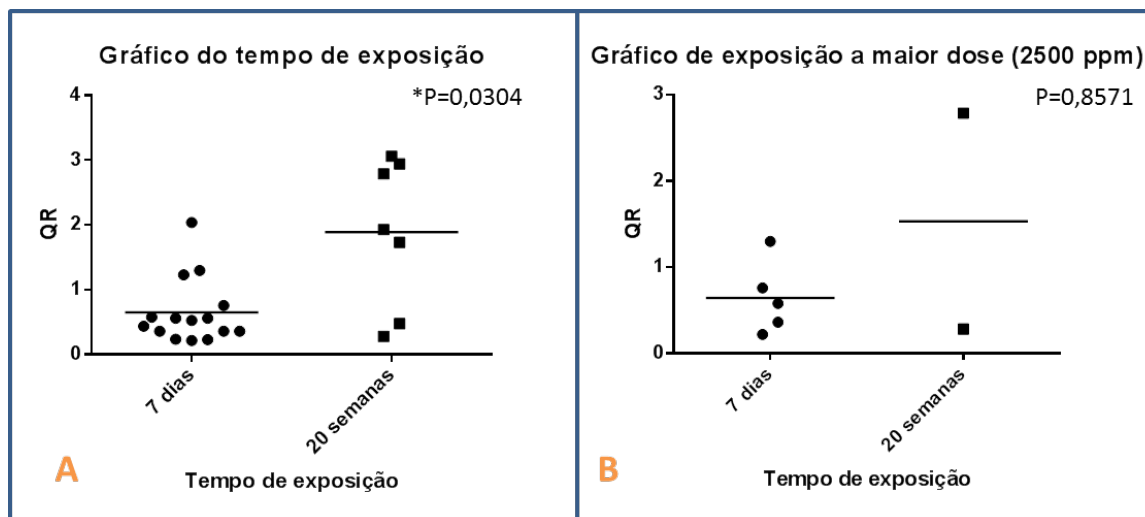


Figura 5. Quantificação relativa (QR) do gene Gpc3. No gráfico **A**, comparou-se os tempos de exposição ao diuron em todas as doses. No gráfico **B** foi comparado os tempos de exposição para a maior dose (2500 ppm).

Os gráficos de amplificação para os animais expostos por 7 dias e 20 semanas estão representados a seguir (Figuras 6 e 7, respectivamente).

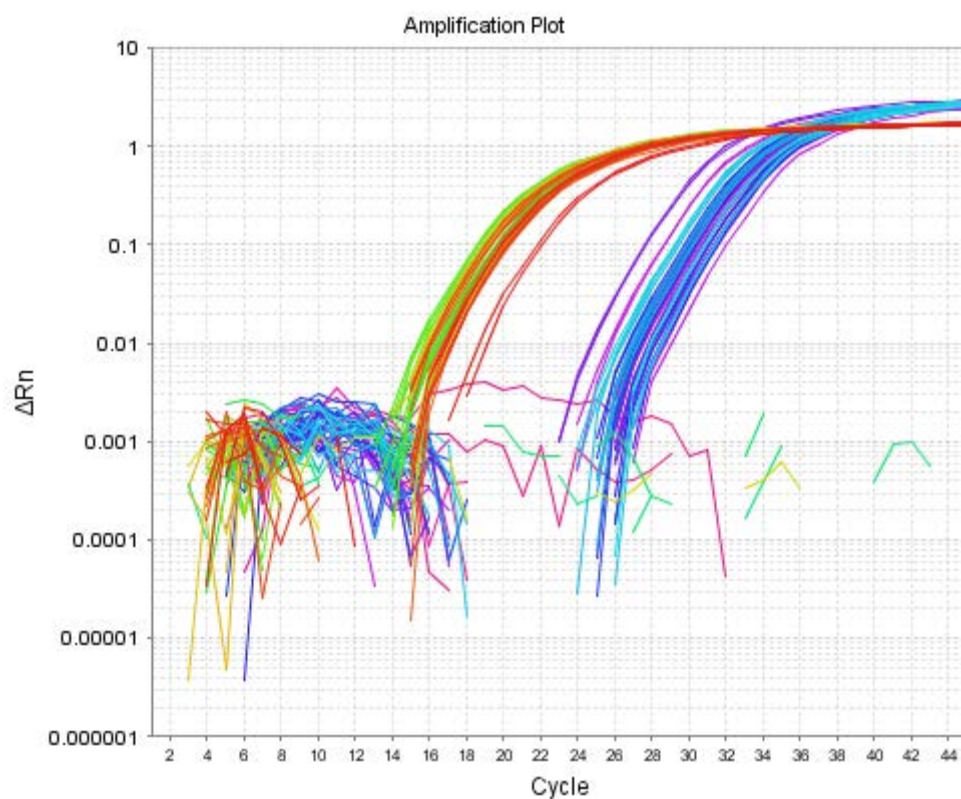


Figura 6. Gráfico de amplificação para o grupo de animais expostos ao diuron por 7 dias. As curvas em vermelho, verde e ocre representam a β -actina e as curvas em tons de azul e tons de roxo representam o Gpc3. Gráfico apresentado em número de ciclos (Cycles: 1 a 45) por intensidade de sinal (Rn).

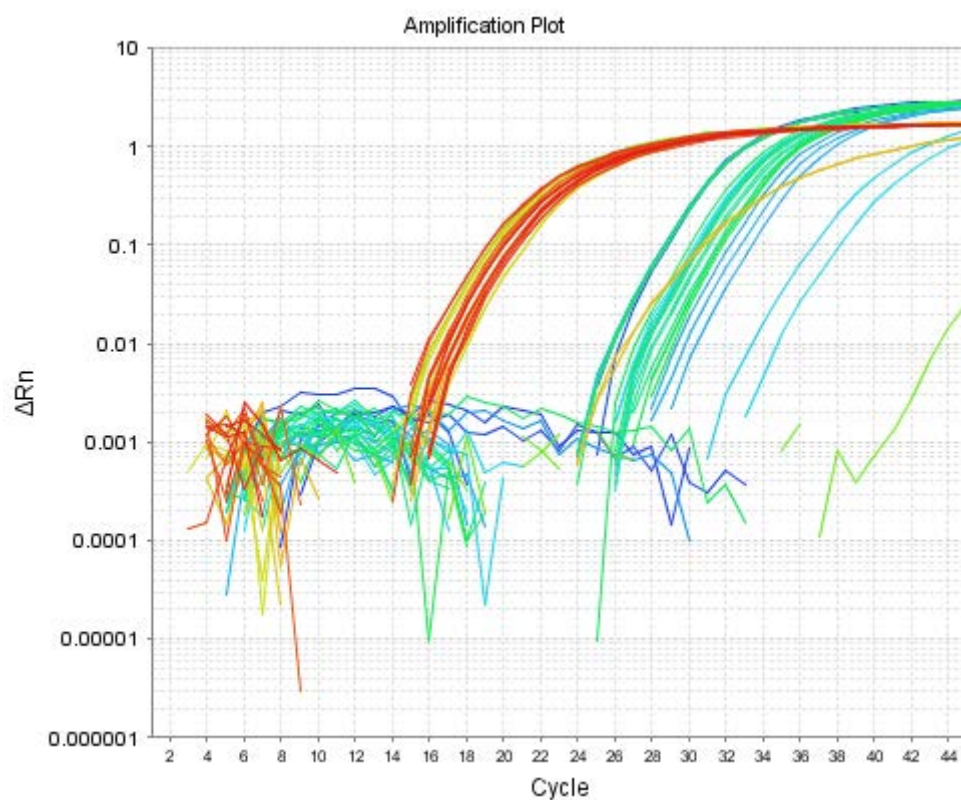


Figura 7. Gráfico de amplificação para o grupo de animais expostos ao diuron por 20 semanas. As curvas em vermelho e ocre representam a β -actina e as curvas em verde e azul representam o Gpc3. Gráfico apresentado em número de ciclos (Cycles: 1 a 45) por intensidade de sinal (Rn).

Discussão

O principal resultado obtido no presente estudo demonstrou que houve diminuição da expressão do gene *Gpc3* em ambos os momentos de exposição ao diuron, sendo esta redução significativa apenas após exposição de 7 dias usando qRT-PCR. Isso apoia os dados obtidos na análise do oligo-*microarray*, que encontrou diminuição de expressão do gene *Gpc3* em ambos os momentos (Ihlaseh et al., 2011; Ihlaseh, 2011, tese). Porém, não pode ser observada relação dose-resposta, uma vez que não houve diferença significativa de expressão de *Gpc3* entre as doses tanto no período de 20 semanas como de 7 dias. É possível que o baixo número amostral, principalmente de urotélio exposto ao diuron por 20 semanas, tenha provocado viés nos resultados estatísticos.

Além disso, este estudo mostrou relação tempo-resposta da expressão de *Gpc3*, comparando os dois períodos de exposição. A expressão do gene *Gpc3* esteve significativamente menor nos animais expostos ao diuron por 7 dias comparados aos animais expostos por 20 semanas. Na maior concentração (2.500 ppm), o número de amostras parece ter sido insuficiente e não foi observada diferença significativa entre a exposição por 7 dias e 20 semanas. Esses dados são contrários aqueles apontados pela análise do oligo-*microarray* (Ihlaseh et al., 2011; Ihlaseh, 2011, tese), que mostraram expressão de *Gpc3* diminuída no período de 20 semanas mais do que no período de 7 dias.

A ausência de relação significativa dose-resposta dos animais expostos ao diuron por 7 dias e 20 semanas e a diminuição de expressão de *Gpc3* em todas as doses (exceto para amostras de baixa dose do grupo de exposição por 20 semanas) revela que não foi possível estimar um NOAEL (No Adverse Observed Effect Level) para este efeito no nível transcricional, visto que não houve nenhuma dose na qual nenhum efeito foi observado.

A expressão diminuída de Gpc3 no período de exposição de 7 dias pode sugerir uma possível associação deste gene com a modulação da via de sinalização Hh (Filmus et al., 2008). Como a baixa expressão de Gpc3 pode aumentar a proliferação celular, por deixar de competir com o receptor de Hh, o Patched, é possível que, a longo prazo, a diminuição de expressão de Gpc3 contribua para aumento da proliferação celular que pode seguir para hiperplasia regenerativa, registrada nos animais expostos ao diuron por 20 semanas (Ihlaseh et al., 2011). No estudo de 7 dias, nos animais expostos a 500 ppm foi observado expressão de Ihh (Indian Hedgehog), um dos três Hedgehogs, indicando que o Gpc3 pode estar envolvido na modulação do Ihh na carcinogênese urotelial (Filmus et al., 2008; Ihlaseh, 2011, tese).

O diuron é capaz de provocar alterações como o aparecimento de células inchadas até mesmo com um dia de exposição na maior dose (2500ppm), e necrose extensiva e esfoliação após exposição prolongada na mesma dose (Da Rocha et al., 2012). A citotoxicidade urotelial seguida por proliferação celular regenerativa são os eventos-chave que compõem o MOA do diuron (Da Rocha et al., 2012). As alterações morfológicas (células inchadas) e ultraestruturais (degeneração epitelial), observadas no urotelio de ratos expostos ao diuron por 7 dias na dose de 2.500 ppm (Da Rocha et al., 2012) podem estar relacionadas às vias moleculares associadas à interação celular e perda de adesão celular observadas por microarray no mesmo período de exposição ao diuron (Ihlaseh, 2011, tese). O gene Gpc3 está incluído em diversas funções biológicas significativamente alteradas na análise de microarray em 7 dias de exposição, como cancer, interação célula-célula, desenvolvimento tecidual, crescimento e proliferação celular, entre outros (Ihlaseh, 2011, tese). Assim, há hipótese de que este gene possa estar

envolvido nas alterações morfológicas vistas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura dos estudos anteriores.

A validação da diminuição de expressão do gene Gpc3 no urotélio de animais expostos ao diuron nos períodos de 7 dias e 20 semanas por qRT-PCR foi apresentada neste estudo. A diminuição da expressão do gene Gpc3 sugere que este gene estaria atuando como um gene supressor tumoral na carcinogênese urotelial induzida pelo diuron. Para avaliar como ocorre a participação deste gene na carcinogênese urotelial, seria interessante analisar a expressão de genes relacionados às vias moduladas pelo gene Gpc3 (p.ex. Wnt e Hh). Além disso, o estudo do gene Gpc3 em tumores uroteliais humanos é um passo importante no conhecimento de seu papel no processo da carcinogênese urotelial.

Referências

- Alonso, L. and Fuchs, E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes. Dev.* 17, p. 1189–1200. 2003.
- Arum C., Anderssen E., Tommeras K., Lundgren S., Chen D., Zhao C. Gene expression profiling and pathway analysis of superficial bladder cancer in rats. Informação sobre o gene Gpc3 disponível em <http://www.ebi.ac.uk/gxa/experiment/EMTAB-104/ENSRNOG00000022684>). *Urology* 75, p.742–749. 2010.
- Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis EK, Terraciano LM. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol*, v. 129, p.899-906. 2008
- Binari, RC, Staveley, BE, Johnson, WA, Godovarti, R, Sasisekharan, R, and Manoukian,, AS. Genetic evidence that heparin like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development*, v.124, p.2623-2632. 1997.
- Cano-Gauci, D.F., Song, H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., and others. Glypican-3-deficient mice exhibit the overgrowth and renal abnormalities typical of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J. Cell.Biol.* v.146, p.225-264. 1999.
- Capurro, M. I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., Filmus, J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with Patched for Hedgehog binding. *Developmental Cell* 14, 700–711. 2008.
- 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.* v. 35, p. 337-47. 2007.

-
- 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. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Tox Sci* 130(2), p. 281-288. 2012.
- Da Rocha, M. S., Nascimento, M. G., Cardoso A. P. F., Lima, P. L. A., Zelandi, E. A., Camargo, J. L. V., de Oliveira, M. L. C. S. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicol. Sci.* v.113, p.37-44. 2010.
- Davis L.A., zur Nieden N. I. Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, p. 2658 – 2674. 2008.
- Desbordes, S.C., and Sanson, B. The glypican Dally-like is required for hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* 130, 6245–6255. 2003.
- Duenas Gonzales , A., Kaya, M., Shi, W., Song, H., Testa, J.R., Penn, L.Z., and Filmus, J. 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.*, v. 141, p. 1407-1414. 1998.
- Filmus J. Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology*, v. 11, p. 19-23. 2001.
- Filmus J., Capurro M., The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. *Cell Cycle* 7:18, 2787-2790. 2008.
- Filmus, J., Church, J., and Buik, R.N. Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine. *Mol. Cell. Biol.*, v. 8, p. 4243-4249. 1995.

-
- Gee J. (1997). Summary on toxicologic data. Diuron. Medical Toxicology Branch. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency. 7p. Accessed on cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/pdfs/231.pdf.
- Geoffroy L., Teisseire H., Couderchet M., Vernet G. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72, p. 178–185. 2002.
- Hooper, J.E., and Scott, M.P. Communicating with hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, p. 306–317. 2005.
- Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res*, v. 57,p. 5179-5184. 1997.
- 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. Transcriptional profile of diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. *Tox.Sci.* 2011.
- Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 205, p. 130–144. 2005.
- Iyer, P. Evidence on the Development and Reproductive Toxicity of Diuron Draft. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section. The Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA. p. 43. 2002.
- Kim H, Xu G-L, Borczuk AC, Busch S, Filmus J, Capurro M, Brody JS, Lange J, D'Armiento JM, Rothman PB, Powell CA. The heparan sulfate proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. *Cell Mol. Biol*,v. 29,p. 694–701. 2003.

-
- Lage H, Dietel M, Froschle G, et al. Expression of the novel mitoxantrone resistance associated gene MXR7 in colorectal malignancies. *Int J Clin Pharmacol Ther*, v. 36, p. 58-60. 1998.
- Li, M., Choo, B., Wong, Z.-M., Filmus, J., and Buik, R.N. Expression of OCI-5/Glypican 3 during intestinal morphogenesis: Regulation by cell shape in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, v. 235, p. 3-12. 1997.
- Lin H, Huber R, Schlessinger D, et al. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, v. 59, p. 807-810. 1999.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* v. 25, p. 402. 2001.
- Man XB, Tang L, Zhang BH, et al. Upregulation of glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int.* v.25,p.962-966. 2005.
- Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, et al. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene*. v.19, p.410-416. 2000.
- Nascimento, M. G., de Oliveira, M. L. C. S., Lima, A. S., and de Camargo, J. L. V. Effects of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder mucosa of male Wistar rats. *Toxicology*. v.224, p.66-73. 2006.
- Pellegrini, M., Pilia, G., Pantano, S., Lucchini, F., Uda, M., Fumi, M., Cao, A., Schlessinger, D., and Farabosco, A. Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev. Dyn.*, v.213, p.431-439. 1998.

-
- Reichsman, F, Smith, L, and Cumberledge, S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J. Cell. Biol.*, v.135, p.819-827. 1996.
- Saikali Z, Sinnett D. Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *Int J Cancer*. v.89, p.418-422. 2000.
- Schlessinger J, Lax, I., and Lemmon, M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, v.83, p.357-360. 1995.
- Stigliano I., Puricelli L., Filmus J., Sogayar M. C., Joffé E., Peters M. G. Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. *Breast Cancer Res Treat* 114, p. 251–262. 2009.
- U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). Chemicals evaluated for carcinogenic potential. Office of Pesticide Programs, Health Effects Division. Science Information Management Branch, Washington, D.C., 106. 2004.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Registration Eligibility Decision for Diuron List A. Case 0046. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, USEPA, Washington, DC, p. 22. 2003.
- Xiang YY, Ladedá V, Filmus J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene*. v.20,p.7408-7412. 2001.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, JD., Leder, P., and Ornitz, DM Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, v.64, p.841-848. 1991.

Zhu ZW, Friess H, Wang L, et al. (2001) Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. Gut. v.48, p.558-564. 2001.