

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

**AVALIAÇÃO DA CARCINOGENICIDADE DO PESTICIDA  
DIURON [3(3,4-DICLOROFENIL) 1,1, DIMETIL URÉIA] EM  
MODELO DE CARCINOGENESE DE MÉDIA DURAÇÃO PARA O  
FÍGADO DE RATOS WISTAR MACHOS**

**TONY FERNANDO GRASSI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Botucatu -SP**

**2006**

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

**AVALIAÇÃO DA CARCINOGENICIDADE DO PESTICIDA  
DIURON [3(3,4-DICLOROFENIL) 1,1, DIMETIL URÉIA] EM  
MODELO DE CARCINOGENESE DE MÉDIA DURAÇÃO PARA O  
FÍGADO DE RATOS WISTAR MACHOS**

**Mestrando: Tony Fernando Grassi**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan**

**Co-Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**Botucatu -SP**

**2006**

FICHA CATALOGR FICA ELABORADA PELA SE O T C. AQUIS. E TRAT. DA INFORMA O  
DIVIS O T CNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTA O - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTEC RIA RESPONS VEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

*Grassi, Tony Fernando*

*Avalia o da carcinogenicidade do pesticida Diuron [3(3,4-Diclorofenil) 1,1, Dimetil ur ia] em modelo de carcinog nese de m dia dura o para o f gado de ratos Wistar machos / Tony Fernando Grassi. Botucatu : [s.n.], 2005.*

*Disserta o (mestrado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.*

*Orientador: Prof. Dr. Lu s Fernando Barbisan*

*Co-orientador: Prof. Dr. Jo o Lauro Viana de Camargo*

*Assunto CAPES: 50503006*

*1. Patologia. 2. Carcinog nese. 3. F gado C ncer. 4. Rato como animal de laboratrio.*

*CDD 616.07*

*Palavras chave: Diuron; Focos GST-P<sup>+</sup>; Hepatocarcinog nese Qu mica; Ratos.*

---

*Dedicatória*

Aos meus pais **Eugenio Grassi** e **Rosangela Maria Grassi** e a minha irmã **Pamela Giovana Grassi**, por oferecerem condições para que eu chegasse até aqui. Por ensinar que a vida é um constante desafio e só vence quem luta e não desanima. Por todas as dificuldades encontradas, pela compreensão que tiveram nas minhas ausências e momentos de fraqueza e cansaço; por sempre estarem ao meu lado. Obrigado.

Amo vocês.

## *"Deus é Fiel"*

A Santíssima Trindade e a Maria Santíssima que nos momentos de dúvidas, indecisões e diálogo constante sempre me mostrava de alguma maneira, que **"Deus é Fiel"** frase presente constantemente no meu dia-a-dia. Obrigado Jesus, amigo, Pai por tua fidelidade na minha vida, por me levantar nos momentos das minhas quedas, por ser meu sustento, amparo, refugio, meu alimento, minha inspiração. Obrigado por permitir que os sonhos fossem realizados. Minha eterna gratidão.

Pelas perdas necessárias e constates de minha vida. Ao meu cão **Nina** por ser tão companheira neste pequeno tempo em que esteve comigo. Por cada momento de brincadeira, alegria, silêncio. Quisera eu ter feito mais, muito mais... mas sou apenas um ser humano limitado. Saudades...

"... a Saudade eterniza a presença de quem se foi e com o tempo esta dor se aquieta, se transforma em silêncio que espera pelos braços da vida um dia reencontrar..."

*Agradecimento Especial*

---



Ao Prof. Dr. **Luis Fernando Barbisan**, amigo e orientador. Por aceitar ser meu orientador no momento em que já não havia mais ninguém disponível a me orientar. Por sua amizade e orientação. Pelos seus ensinamentos, apoio, dedicação e confiança. Por enxergar e mostrar a simplicidade em meio a complexidade, Obrigado.

*Agradecimientos*

---

Ao Prof. Dr. **João Lauro Viana de Camargo** pela amizade e orientação desde o meu início no Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – Toxican e me ensinando a verdadeira arte de se fazer pesquisa científica. Pelos ensinamentos e exemplos. Por permitir a utilização do laboratório e equipamentos, Meus eternos agradecimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Daisy Maria Fávero Salvadori** por permitir o meu primeiro estágio, onde minha vida científica começou. Pela amizade, pelos momentos de alegria, convívio e pelo exemplo de trabalho árduo, obrigado.

Aos amigos do anexo **Andréia Wludarski, Clarissa Scolastici, João Felipe Mota, Liane Ziliotto, Marina Mariko Sugui, Merielen Garcia Nascimento, Patrícia Lepage Alves de Lima e Rodrigo Otávio Alves de Lima** pela convivência diária, pelos almoços, lanches e jantares; pelos momentos de seriedade, discussão científica, farras e assuntos aleatórios que nos faziam rir e ver que a vida é muito mais bela e feliz quando se há alegria e quando se têm amigos por perto. Obrigado por tudo.

À amiga e secretária do Curso de Pós-Graduação em Patologia, **Tânia Alice Andrade**, pela simpatia, atenção, amizade. Por sempre atender aos meus pedidos quando precisava de informações, materiais e pão de mel.

Aos amigos **Glória Aparecida Rodrigues e Paulo César Georgete** pela amizade e por cuidar dos nossos animais e auxiliar-nos durante todo o período no biotério.

Aos amigos **Maria Luiza Falaguera Ardanaz** e **Paulo Roberto Cardoso** pela amizade e dedicação no preparo do nosso material histológico.

Aos colegas e amigos do Toxican **Ana Paula Bazo**, **Aniele Radzikoski Agner**, **Alexandre Domingues**, **Bruno Ribeiro Darros**, **Carla Adriene Franchi**, **Carla Lombardi**, **Cibele Aparecida Tararam**, **Cristina Dorico**, **Daniel Araki Ribeiro**, **Danillo Pinhal**, **Elaine Aparecida de Camargo**, **Glenda Nicioli Silva**, **João Francisco Lozano Luvizutto**, **João Paulo dce Castro Marcondes**, **Kelly Furtado**, **Marcelo Sady Plácido Ladeira**, **Meire França Martinez**, **Priscilla Davidson Negraes**, **Renato Paschoal**, **Roueda Abou Said**, **Shadia Muhammad I hlaseh** pela amizade e convívio no nosso ambiente laboratorial.

As amigas de estudo... e que semana foi aquela... **Mariana Gobbo Braz** e **Nunes da Silva**...**Renata** pela amizade e pelos momentos de risos e stress que passamos juntos. Iniciamos juntos nessa jornada de pós-graduação e juntos estamos finalizando, Obrigado.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Márcia Guimares Silva, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marchesan Rodrigues e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha pela amizade e ensinamentos.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, Dr<sup>a</sup> Denise Fecchio pela amizade e profissionalismo nas decisões. Pelos apoios e atendimentos as minhas solicitações, Obrigado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucat-SP, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos, eternos amigos, nascidos pela Fé e pela paixão por música católica Aline Aparecida Martins, Adriano Militão Leite, Alessandra Corrêa de Medeiros Silva, Alessandro Militão Leite, Ana Paula Feliciano Maitã Baptista (Paulinha), Bianca da Silva, Camila Torres da Silva, Carolina Aparecida Lopes, Elaine Aparecida de Camargo, Elaine Cristina Gianazzi, Fabiano Augusto de Medeiros, Fabrício dos Santos Penaforte, Fernanda Pavan Rocha, Helenice de Fátima de Lego Marcello, Rafael Silva Marcello, Renata Aparecida de Lego Leite, Renato Corrêa

de Medeiros, Tatiana Torres da Silva, Telma Marques dos Santos Medeiros, pela amizade, oração, companheirismo, alegrias, canções tocadas e cantadas. Pelos momentos vividos e compreensão das minhas ausências, e falhas. Por me ensinarem que quem encontra um amigo, encontra um tesouro. Obrigado por estarem presentes em minha vida e na vida da minha família. A vocês meus eternos agradecimentos.

À amiga **Maria Rita Piloto Neves**, pela amizade, pelos momentos de diálogo, risos e pelas aulas de inglês. Obrigado, Thank You.

À Coordenação de **Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES** pelo auxílio financeiro (Bolsa)

Ao Núcleo de **Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – Toxican**, pelo suporte financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho

## Aos Animais

“Foste um instrumento de nosso aprendizado?”.

Foste apenas um objeto de experiência?

Não!!!

Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício da humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre:

Muito Obrigado!

(Desconhecido)



*Índice*

---

# Índice Geral

Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	v
Índice de Anexos.....	vi

## Capítulo I

1. Revisão da Literatura .....	1
1.1. Pesticidas e efeitos biológicos do Diuron.....	1
1.2. Hepatocarcinogênese química e o modelo DEN-HP.....	7
2. Referências Bibliográficas.....	16
3. Objetivo .....	29

## Capítulo II

### Manuscrito

Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	30
2. Materiais e Métodos.....	34
2.1. Animais e ambiente de experimentação.....	34
2.2. Preparo da ração adicionada com Diuron ou Hexaclorobenzeno.....	35
2.3. Delineamento Experimental.....	35
2.4. Coleta de sangue e de órgãos selecionados.....	36
2.5. Análise histológica de órgãos selecionados.....	37
2.6. Análise imunoistoquímica e quantificação de focos GST-P <sup>+</sup> .....	37

2.7. Análises de proliferação celular e apoptose .....	38
2.8. Análise estatística .....	39
<b>3. Resultados</b> .....	<b>40</b>
3.1. Período experimental .....	40
3.2. Consumo de ração basal e de Diuron .....	40
3.3. Peso corpóreo dos animais .....	41
3.4. Peso relativo dos órgãos .....	41
3.5. Análise histológica e bioquímica .....	42
3.6. Análise quantitativa de focos GST-P <sup>+</sup> .....	44
3.7. Análise de proliferação celular e apoptose no fígado .....	44
<b>4. Discussão</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Referências</b> .....	<b>51</b>
<b>6. Tabelas</b> .....	<b>57</b>
<b>7. Figuras</b> .....	<b>64</b>
<b>8. Anexos</b> .....	<b>74</b>

## Índice de Tabelas

### Capítulo I

<b>Tabela 1</b> - Taxa de positividade (%) de 313 compostos químicos no teste de média duração (protocolo DEN-HP).....	15
--	----

### Capítulo II

#### Manuscrito

<b>Tabela 1</b> - Consumo de ração basal e de Diuron pelos animais dos diferentes grupos experimentais.....	57
<b>Tabela 2</b> - Peso corpóreo inicial e final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	58
<b>Tabela 3</b> - Pesos relativos de órgãos selecionados dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.....	59
<b>Tabela 4</b> - Incidência (%) de alterações histológicas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	60
<b>Tabela 5</b> - Desenvolvimento de focos hepáticos alterados (fenotipagem e expressão de GST-P) nos animais dos grupos experimentais iniciados pela dietilnitrosamina (DEN).....	61
<b>Tabela 6</b> - Incidência (%) de alterações renais nos animais dos diferentes grupos experimentais.....	62
<b>Tabela 7</b> - Níveis séricos de creatinina e ALT (alanina aminotransferase) dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do período experimental.....	63

#### Anexos

<b>Tabela 1</b> - Consumo de água dos animais dos diferentes grupos experimentais durante o período experimental.....	82
<b>Tabela 2</b> - Peso absoluto de órgão selecionados dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.....	83

## Índice de Figuras

### Capítulo I

- Figura 1** – Estrutura molecular do herbicida Diuron.....14
- Figura 2** - Protocolo experimental do bioensaio de média duração para detecção de agentes cancerígenos no fígado de ratos (Modelo DEN-HP).....14

### Capítulo II

#### Manuscrito

- Figura 1** - Estrutura molecular do Diuron.....66
- Figura 2** - Delineamento experimental.....67
- Figura 3** - Gráfico de evolução de peso corpóreo médio semanal.....68
- Figura 4** - Cortes histológicos de fígado corados pela HE (A-F).....69
- Figura 5** - Corte histológico de rim corado pela HE (A-G).....72
- Figura 6** - Macroscopia e microscopia do Baço.....73
- Figura 7** - Cortes histológicos de fígado: Hepatócitos PCNA positivos (A) e Hepatócito em apoptose (B).....70
- Figura 8** - Índices de proliferação celular pelo antígeno PCNA (IM% PCNA) e de apoptose (IA %) no fígado.....71

### Anexos

- Figura 1** - Processamento de amostras (órgãos) para o processamento histológico.....78

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1</b> – Atestado de Sanidade Animal .....	74
<b>Anexo 2</b> – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	75
<b>Anexo 3</b> – Processo Histológico .....	76
<b>Anexo 5</b> – Detecção Imunoistoquímica de focos GST-P positivos e de núcleos PCNA positivos.....	79
<b>Anexo 6</b> – Tabela 1 - Consumo de água dos animais dos diferentes grupos experimentais durante o período experimental.....	82
<b>Anexo 7</b> – Tabela 2 - Peso absoluto de órgão selecionados dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.....	83

*Capítulo I*

*Revisão da Literatura*

---

## **1. Revisão de Literatura**

### **1.1. Pesticidas e efeitos biológicos do Diuron**

Os chamados pesticidas, terminologia que se refere no Brasil genericamente aos praguicidas, defensivos agrícolas ou agrotóxicos, constituem-se de substâncias químicas utilizadas no combate as pragas das lavouras e que nestas designações enquadram-se às classes: inseticidas - que eliminam insetos; acaricidas – que eliminam ácaros ou carrapatos; fungicidas – que eliminam fungos parasitas; herbicidas – que combatem ervas daninhas, e raticidas - que eliminam pequenos roedores.<sup>1</sup> A existência de centenas de ingredientes ativos e de milhares de formulações diferentes que constituem os pesticidas demonstram o valor desses químicos, principalmente, frente à necessidade mundial de aumento da produtividade agrícola.<sup>1,2</sup> A introdução dos defensivos agrícolas durante a década de 1950, ou seja, após a segunda guerra mundial, foi associada à necessidade do aumento da produção de alimentos, o que acarretou em uma revolução da prática agrícola pela redução da incidência de ervas daninhas, vetores de doenças (principalmente de insetos) e de agentes patogênicos.<sup>2</sup> A cada ano são produzidos no mundo cerca de 1,5 milhões de toneladas de pesticidas a um custo de 30 milhões de dólares.<sup>2</sup> Atualmente, o Brasil é o 4º maior consumidor de pesticidas no mundo e os herbicidas têm se destacado com o aumento de 171 para 251 mil toneladas nos últimos 4 anos.<sup>3</sup>

O uso de pesticidas permite a redução, proteção, controle e restituição de plantações, florestas e o armazenamento de produtos madeireiros, livres de pragas e



de doenças endêmicas.<sup>4,5</sup> Em nenhum outro lugar os defensivos agrícolas são mais valiosos que no desenvolvimento de países de clima tropical ou mais temperado, que buscam entrar na economia mundial através da fruticultura e horticultura fora de época. Tais países estão se tornando importantes celeiros para o mundo, sendo capazes de realizarem até três colheitas por ano. Porém, essas metas não podem ser alcançadas sem o aumento do uso dos pesticidas, principalmente inseticidas, herbicidas e fungicidas, químicos que não são utilizados na chamada agricultura tradicional ou orgânica.<sup>6</sup>

Na fase inicial do uso dos pesticidas, poucos estudos foram realizados visando se estabelecer o impacto dessas substâncias químicas na saúde humana<sup>7,8</sup> Na década de 1960, tornou-se evidente que a persistência dos pesticidas no meio ambiente poderia produzir grande impacto ecológico.<sup>9,10</sup> Esse cenário levou ao maior número de investigações que exploravam os possíveis efeitos deletérios dessa exposição à saúde humana.<sup>11,12</sup>

Devido aos efeitos tóxicos de diversos pesticidas, as agências governamentais e a Organização Mundial da Saúde (OMS) têm classificado os seus efeitos como sendo de classe Ia (extremamente tóxico), classe Ib (altamente tóxico), classe II (moderadamente tóxico) e de classe III (levemente tóxico) e os que apresentam ingredientes ativos de baixa periculosidade.<sup>13,14</sup> Substâncias químicas utilizadas na agricultura são reconhecidas como possíveis agentes tóxicos, teratogênicos, mutagênicos e/ou cancerígenos para o ser humano.<sup>15,16,17</sup> A exposição a estas substâncias, em especial aos pesticidas, ocorre não somente em

trabalhadores rurais e agricultores, que manipulam diretamente estes compostos (exposição ocupacional), mas também na população em geral através da ingestão de água e alimentos contaminados (exposição acidental). Portanto, a avaliação do potencial toxicológico (periculosidade) de pesticidas pode fornecer informações importantes para a implementação de medidas governamentais e de saúde pública que regularizem a sua utilização em níveis seguros de exposição humana.<sup>16,18</sup> De acordo com estudos experimentais, pelo menos 50 diferentes pesticidas utilizados no mundo podem se apresentar como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer em seres humanos. A estimativa é de que de cerca de 1% dos casos de câncer nos EUA possa ser atribuída à exposição a pesticidas,<sup>19</sup> em especial a classe dos herbicidas que apresentam dioxinas presentes em sua composição.<sup>20,21</sup>

O Diuron - [3(3,4-diclorofenil) 1,1, (dimetil uréia)] CAS 330-54-1, (Figura 1), herbicida que pertence à família da fenilamina e subclasse da feniluréia, vem sendo utilizado na agricultura para controle seletivo de plantas daninhas, gramíneas e musgos nas culturas de frutas, algodão, cana-de-açúcar, alfafa e trigo. Sua classificação toxicológica é de nível de II a III (altamente a moderadamente tóxico) e a ambiental é de nível II (produto muito perigoso) (Sistema Pós-Registro de Informações sobre Agrotóxicos (SIA) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil).

Em sua forma pura, o Diuron apresenta coloração cristalina, é um composto não-iônico com moderada solubilidade em água (42 mg/L a 20°C). Sua hidrólise é desprezível em pH neutro, mas aumenta em algumas condições em que o pH se

torna fortemente ácido ou alcalino. Absorvido pelas raízes e folhas das plantas daninhas, o Diuron atua sobre o processo de fotossíntese pela inibição da produção de oxigênio e pelo bloqueio da transferência de elétrons ao nível do fotosistema II.<sup>22</sup> Devido a sua alta persistência no ambiente (um mês a um ano), o Diuron pode ser encontrado em locais como solo, sedimentos e água de superfície.<sup>23,24</sup> Entretanto, no processo de degradação biótica ou abiótica do Diuron pode-se gerar compostos tóxicos, tais como a 3,4 dicloroanilina (3,4-DCA).<sup>22</sup>

Estudos toxicológicos indicam que o Diuron é absorvido com facilidade pelo trato gastrointestinal e sistema respiratório, sofre metabolismo hepático e seus metabolitos, podem ser encontrados na urina de pessoas expostas.<sup>25,26</sup> O Diuron apresenta baixa toxicidade sistêmica para mamíferos e aves e toxicidade moderada para invertebrados aquáticos.<sup>22</sup>

A dose letal oral (DL<sub>50</sub>) do Diuron para ratos foi estabelecida como sendo de 1017 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) para dieta normal e de 437 mg/kg e 2390 mg/kg de p.c. para ratos tratados com dietas de alto e baixo teor de proteína, respectivamente.<sup>27</sup> Em outro estudo em ratos a DL 50 oral em ratos foi determinada como sendo de 3400 mg/kg de p.c..<sup>28</sup>

Estudos com Diuron associado com hexaclorociclohexano (HCH), um inseticida descrito como hepatocancerígeno, demonstraram alta mortalidade e perda de peso em ratos machos albino expostos às concentrações de 2500 ppm e 500 ppm na ração, respectivamente.<sup>29,30</sup> Em estudos experimentais, o Diuron

---

ocasionou irritações oculares e em mucosa de coelhos expostos<sup>31</sup> e fetotoxicidade e aumento do número de malformações fetais em ratos.<sup>32</sup>

Em dois estudos crônicos de toxicidade oral do Diuron em ratos e cães foram registrados resíduos desta substância em alguns tecidos, sendo os níveis mais altos observados em fígado e rim.<sup>33</sup> Nos estudos crônicos, os efeitos tóxicos principais da ingestão crônica de Diuron foram descritos como sendo a perda de peso e anormalidades no sangue, fígado e baço, onde as doses médias finais foram de 0, 0,625, 3,125, 6,25 e 31,25 mg/kg de p.c. por dia durante dois anos para cães da raça Beagle (dois machos e três fêmeas) e de 0, 1,25, 6,25, 12,5 ou 125 mg/kg de p.c. por dia para 35 ratos (machos e fêmeas).<sup>28</sup> Na concentração de 125 ppm (dose de 3,125 mg/kg em cães e 6,25 mg/kg em ratos) foram observados traços de pigmentos anormais no sangue em alguns animais, mas a incidência não foi significativa. Na concentração de 250 ppm (6,25 mg/kg em cães e 12,5 mg/kg em ratos) foram observadas alterações hematológicas, perda de peso, hemosiderose no fígado e hiperplasia eritróide. Não houve evidência de carcinogenicidade nestes estudos, mas esta afirmação não pode ter ser tomada como verdadeira em decorrência de várias falhas metodológicas e de delineamento dos estudos.<sup>28</sup>

Na literatura são encontrados poucos trabalhos sobre a avaliação do potencial mutagênico e/ou cancerígeno do herbicida Diuron. O Diuron não mostrou atividade mutagênica na maioria dos testes *in vitro* com microrganismos, com ou sem ativação metabólica.<sup>34</sup> Entretanto, efeito mutagênico foi relatado em teste com *Salmonella typhimurium* com ativação metabólica, e em ensaios de

biosíntese de DNA testicular.<sup>35,36</sup> O Diuron foi negativo em dois testes *in vitro* com células de mamíferos: o de mutação gênica em células de ovário de hamster chinês e o de síntese não programada de DNA (UDS) em hepatócitos de rato.<sup>37</sup> Em testes *in vivo*, o Diuron induziu a formação de micronúcleo em medula óssea de camundongos,<sup>38</sup> mutações dominantes letais em camundongos Swiss,<sup>39</sup> além de efeitos clastogênicos em ratos (em teste citogenético *in vivo*).<sup>37</sup>

O potencial de carcinogenicidade do Diuron vem sendo reavaliado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) em decorrência de resultados positivos observado em estudos de longa-duração em roedores. Em estudo realizado pela Bayer, este herbicida aumentou a incidência de alguns tipos de tumores em camundongos NMR1 e em ratos Wistar.<sup>40,41,42</sup> Em ratos, o Diuron administrado na ração (2500 ppm) por dois anos aumentou a incidência de pólipos e carcinomas de bexiga urinária tanto em machos como em fêmeas da linhagem Wistar; além disso, os ratos machos também apresentaram tendência ao aumento do desenvolvimento de papilomas e carcinomas da pelve renal.<sup>41,42</sup> Dois tumores renais, considerados raros para esta espécie, foram também observados em ratos Wistar machos expostos à maior concentração de Diuron. As fêmeas de camundongos NMR1, expostas a três concentrações de Diuron na ração por 24 meses (25, 250 e 2500 ppm), apresentaram tendência para o aumento da incidência de carcinomas de mama. Esta incidência foi considerada maior do que os dados de incidência histórica deste tipo de tumor em fêmeas controle em estudos com a mesma linhagem de camundongos.<sup>40,42</sup>

---

O Diuron foi identificado como agente iniciador da carcinogênese de pele em camundongos.<sup>43</sup> Em estudo de 14 meses de duração, desenvolvido para se avaliar o possível efeito hepatocarcinogênico do Diuron, Agrawal & Kumar (1999) mostraram que o Diuron não apresentou atividade carcinogênica para o fígado de ratos, ou seja, não induziu o aparecimento de tumores.<sup>44</sup> O tratamento com Diuron não induziu o aparecimento de tumores hepáticos em ratos Wistar machos quando administrado na ração na concentração de 2500 ppm por quatro meses seguida pela administração por oito meses do promotor hexaclorociclohexano (HCH).<sup>44</sup> Da mesma forma, ratos Wistar machos tratados com 500 ppm de Diuron na ração por oito meses, após iniciação com 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, 200 ppm por 19 dias), não desenvolveram tumores hepáticos ao final do experimento.<sup>44</sup> Entretanto, esses autores não mencionaram a presença e/ou incidência de lesões hepáticas pré-neoplásicas nos grupos tratados com Diuron.

## **1.2. Hepatocarcinogênese química e o modelo DEN-HP**

O desenvolvimento do câncer hepático ou a hepatocarcinogênese é um processo de múltiplas etapas que consiste de pelo menos de três etapas principais: iniciação, promoção e progressão. Desta forma, a hepatocarcinogênese é um processo complexo, resultante da ação de agentes químicos, físicos ou biológicos, ou da combinação desses sobre células individuais, nas quais ocorrem danos progressivos em genes que controlam o crescimento e/ou diferenciação celular acarretando na expansão clonal de células iniciadas, que podem progredir para formação de neoplasias.<sup>45,46,47</sup> A etapa de iniciação caracteriza-se por alterações

irreversíveis e permanentes em bases do DNA, transformando hepatócitos normais, após um ciclo de divisão celular, em hepatócitos iniciados (mecanismo genético).<sup>45,47</sup> Embora a teoria genética da iniciação seja bem aceita, a formação de células iniciadas parece ser também um evento mediado por mecanismos epigenéticos.<sup>48,49,50</sup> Por simples reação imunoistoquímica, hepatócitos iniciados podem ser detectados no fígado até mesmo 2 a 3 dias após a exposição a um agente hepatocancerígeno, através da expressão da enzima glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P).<sup>51</sup>

A promoção envolve a proliferação de células iniciadas, levando ao crescimento acelerado e a eventuais alterações genéticas adicionais, o que favorece o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.<sup>45,47</sup> A etapa de promoção é reversível, em especial após a retirada do agente promotor e estabelecimento do processo de “remodelação” (re-diferenciação para o fenótipo normal) de focos de hepatócitos alterados fenotipicamente (FHA) e nódulos hepáticos.<sup>52,53</sup> A progressão é caracterizada pela instabilidade genômica que as lesões hepáticas apresentam em decorrência do acúmulo de alterações genéticas, modificações fenotípicas e caráter de malignidade.<sup>46,47,54,55</sup>

O câncer hepático induzido quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações seqüenciais caracterizadas inicialmente por FHA, seguido pelo desenvolvimento de nódulos, adenomas e, por fim, do câncer. A demonstração de que estas alterações estão seqüencialmente associadas, indica que

os focos representam etapas pré-neoplásicas, podendo ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática.<sup>54,56,57,58</sup>

Diferentes tipos de FHAs, têm sido identificados no fígado de ratos, na dependência das alterações de seus componentes citoplasmáticos, como glicogênio, retículo endoplasmático, ribossomos e peroxissomos.<sup>59,60</sup> Sob coloração de rotina (HE), as alterações do citoplasma permitem classificar os FHAs em: focos de células claras, focos de células acidofílicas, focos de células intermediárias, focos de células anfófilas, focos de células xenomórficas, focos de células tigróides, focos de células basofílicas e focos de células mistas. Desta forma, podem ser identificadas três linhagens hepatocíticas principais durante a evolução dos FHAs a hepatocarcinomas em roedores: glicogenólica-basofílica, anfófila-basofílica e xenomórfica-basofílica.<sup>61</sup> Os FHAs também são considerados lesões precursoras de adenomas e hepatocarcinomas humanos.<sup>62,63</sup>

A demonstração de que os hepatócitos dos focos exibem atividade enzimática diferente dos hepatócitos normais permite detectá-los imuno e histoquimicamente através de marcadores enzimáticos como gama-glutamiltanspeptidase (GGT), adenosiltrifosfatase (ATPase), glicose-6 fosfatase (G-6-Pase) e glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P).<sup>55,59,64,65,66,67</sup> Esta última é reconhecida como um dos melhores marcadores dos focos pré-neoplásicos no fígado de rato.<sup>66,68,69</sup>

A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, placenta, coração e outros órgãos de ratos machos, mas significativamente elevada nos rins e pâncreas.<sup>66</sup> Nódulos hiperplásicos e tumores



hepáticos, induzidos em ratos pela utilização do modelo de Solt & Faber (1976), apresentam conteúdos de GST-P cerca de 20 a 50 vezes e de 10 a 30 vezes maiores, respectivamente, quando comparados aos valores de fígados normais (cerca de  $34 \pm 9,4$   $\mu\text{g/g}$  de tecido).<sup>66,70,71</sup> Esses níveis são acompanhados pelo aumento da expressão do mRNA da GST-P em nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos.<sup>72</sup> A expressão aumentada da GST-P em tumores hepáticos pode ser consequência, entre outros fatores, do processo de hipometilação de sítios CpG da região promotora do gene da GST-P, o que contribuiria para aumento da expressão desse gene.<sup>73</sup>

O significado biológico da expressão aumentada da GST-P em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas não foi totalmente estabelecido. No entanto, este fato parece ser importante nas etapas iniciais do processo de hepatocarcinogênese química, assim como na adaptação e crescimento seletivo de células iniciadas em ambiente químico tóxico.<sup>74,75</sup> A GST-P, em contraste às outras famílias de GST, parece ser mais eficiente na neutralização de cancerígenos hidrossolúveis (fracos eletrófilos), e sua expressão é pouco sensível à inibição por ânions orgânicos ou induzida de forma inespecífica por compostos químicos e cancerígenos.<sup>66, 74,75,76</sup>

A detecção e regulação apropriada de substâncias químicas com potencial cancerígeno para o ser humano, em especial de pesticidas são de primordial importância para a prevenção de neoplasias na população humana.<sup>77,78</sup> Os estudos a longo prazo (2 anos) em roedores são ainda os testes mais validados internacionalmente para identificação do potencial cancerígeno de agentes

químicos.<sup>79</sup> Porém, o vasto número de compostos químicos introduzidos em nosso ambiente em anos recentes supera a capacidade existente para avaliar sua carcinogenicidade por este método convencional. Além disso, o teste de longa duração é caracterizado pelo alto custo, pela utilização grande de animais e, principalmente, pela demora na obtenção de resultados.<sup>12,80, 81</sup>

O fígado tem se destacado como órgão preferencial para estudo das diferentes etapas da carcinogênese química experimental devido ao seu tamanho, sua relativa homogeneidade estrutural e em particular, pela facilidade de indução e detecção de lesões pré-neoplásicas.<sup>56,59,82,83</sup>

Dentre os protocolos de média duração propostos para o estudo da carcinogênese química, destacam-se os que utilizam o fígado como órgão-alvo.<sup>59,68,82,83</sup> Devido à consistência dos resultados encontrados, estes protocolos - baseados nos conceitos de iniciação e promoção da carcinogênese química - vêm sendo utilizados como testes alternativos ou complementares ao teste de longa duração em roedores para a detecção de cancerígenos químicos.<sup>68,69,82,83,84</sup>

O protocolo proposto por Ito et al. (1988), desenvolvido a partir do modelo de Solt & Farber (1976), tem a seguinte seqüência de eventos: iniciação química da carcinogênese - hepatectomia parcial – promoção eventual dependendo da substância testada.<sup>70,82</sup> O ensaio, padronizado na linhagem de ratos Fischer 344, é constituído por três grupos experimentais (Figura 2): No Grupo 1, a iniciação da hepatocarcinogênese é estabelecida por uma dose única intraperitoneal (i.p.) de dietilnitrosamina (DEN) (200 mg/kg de peso corpóreo). Após duas semanas, os animais recebem a substância-

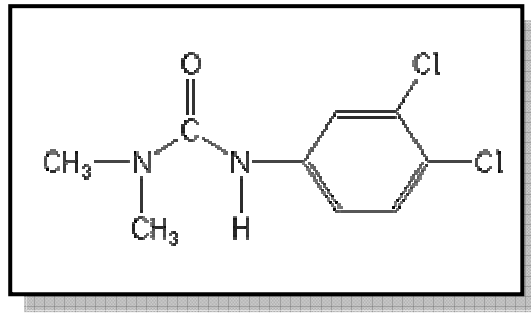
---

teste na ração basal, na água de beber ou por injeções (i.p., s.c. ou i.v.) durante seis semanas. Na terceira semana, os animais são submetidos a hepatectomia parcial (HP) de 70% (retirada dos lóbulos esquerdo e lateral direito). No Grupo 2, os animais são submetidos à iniciação e à HP da mesma forma que os animais do Grupo 1, sem, no entanto, receberem qualquer tipo de tratamento adicional (substância-teste). Finalmente, os animais do Grupo 3 recebem dose única intraperitoneal (i.p.) de NaCl 0,9% (veículo de diluição da DEN) e, então, são submetidos à administração da substância-teste e à HP. A eutanásia de todos os animais ocorre ao final da oitava semana.

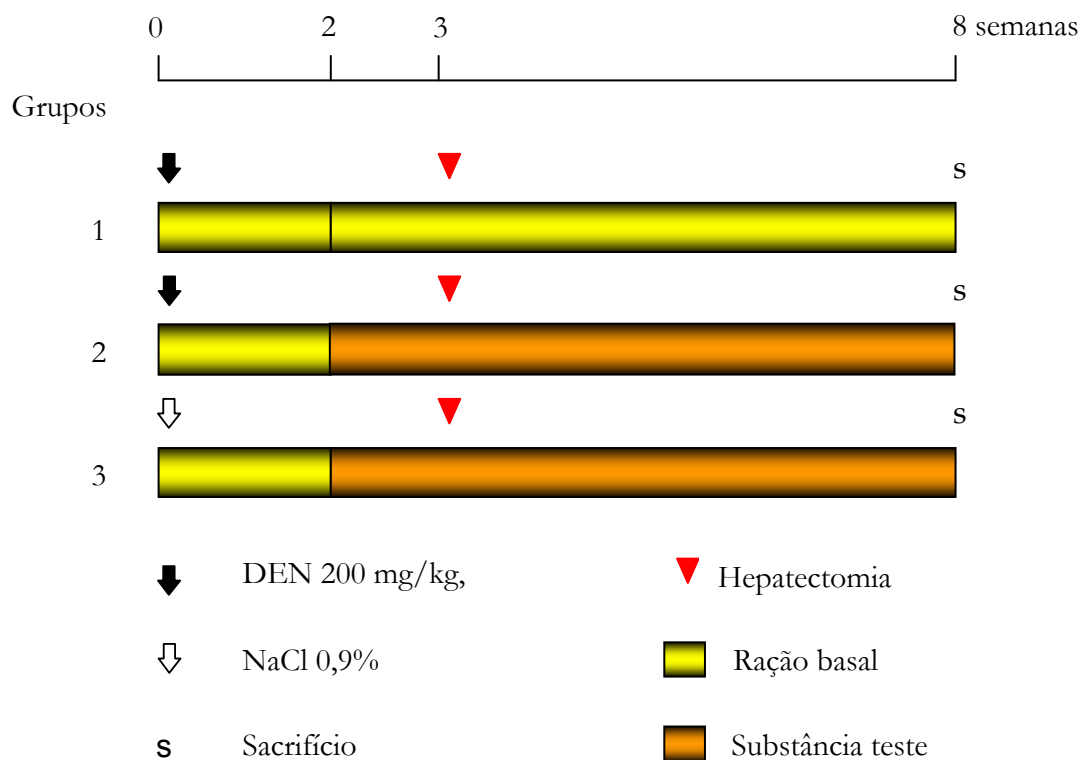
A avaliação do potencial cancerígeno da substância-teste é feita pela quantificação do número (focos/cm<sup>2</sup>) e da área agregada (mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) de focos de hepatócitos que expressam a enzima GST-P<sup>+</sup> (final da oitava semana). Se a substância-teste aumenta o número e/ou a área agregada de focos hepáticos GST-P<sup>+</sup>, esta é classificada como substância promotora da hepatocarcinogênese. Este protocolo é delineado para a avaliação do potencial promotor de substâncias químicas, mostrando-se adequado para a avaliação da carcinogenicidade de pesticidas de forma isolada<sup>79,81,85,86</sup> ou em misturas complexas em baixas doses.<sup>87,88,89</sup>

Neste modelo, já foram analisadas cerca de 313 substâncias químicas (Tabela 1). Embora haja preocupação com resultados falso-negativos e falso-positivos neste modelo, os resultados já obtidos mostraram boa correlação com os achados em testes de longa duração (aparecimento de tumores hepáticos), o que valida o protocolo.<sup>90,91</sup> O modelo DEN-HP se mostra adequado para a detecção de

substâncias hepatocancerígenas, genotóxicas (97%) e não-genotóxicas (88%), mas apresenta baixa sensibilidade (23%) para detecção de cancerígenos que têm organotropismo diferente do fígado. De qualquer modo, por ser de execução relativamente curta e pouco onerosa, este modelo é conveniente para “screening” de substâncias que não foram submetidas adequadamente ao teste convencional de carcinogenicidade. Naturalmente, o agente que se revelar positivo no protocolo DEN-HP deve ser encarado com um agente promotor do processo de hepatocarcinogênese química.



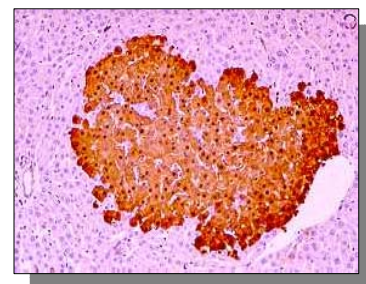
**Figura 1** – Estrutura molecular do herbicida Diuron



**Características**

- ♦ Curta duração (8 semanas de duração)
- ♦ Ratos Fisher machos F344 (15 a 20 ratos / grupo)
- ♦ Parâmetro: Desenvolvimento (número e área) de lesões pré-neoplásicas identificadas pela expressão imunohistoquímica GST-P.

(Figura ao lado)



**Foco GST-P Positivo**

**Figura 2-** Protocolo experimental do bioensaio de média duração para detecção de agentes cancerígenos no fígado de ratos (Modelo DEN-HP) (Ito et al., 1988)

Tabela 1- Taxa de positividade (%) de 313 compostos químicos no teste de média duração (protocolo DEN-HP), distribuídos segundo resultados do teste de Ames e do potencial cancerígeno observado em testes de longa duração.

Potencial Cancerígeno	Teste de Ames			Total
	Positivo	Negativo	Desconhecido	
Hepatocancerígeno	30/31 (97) <sup>a</sup>	29/33 (88) <sup>b</sup>	1/1 (100)	60/65(92)
Não-hepatocancerígeno	7/26 (27)	2/15 (13)	1/2 (50)	10/43 (23) <sup>d</sup>
Não-cancerígeno	0/6 (0)	1/40 (3) <sup>c</sup>	0/2 (0)	1/48 (2) <sup>d</sup>
Desconhecido	4/14 (29)	30/86 (36)	14/57 (24)	48/157 (32)
Total	41/77 (53)	62/174 (36)	16/62 (25)	119/313 (38)

<sup>a</sup> Resultado falso negativo: 4,4'-diaminodifenilmetano (DDPM); <sup>b</sup> Resultado falso - negativo: clofibrato, di(2-etilhexil)ftalato, di(2-etilhexil)adipato, ácido tricloroacético; <sup>c</sup> Resultado falso-positivo: malation; <sup>d</sup> Total de 11 compostos químicos foram positivos nesse modelo, embora a hepatocarcinogênese não foi comprovada.

*Referências*

---

---

**2. Referências \***

1. Soares JL. Dicionário etimológico e circunstanciado de Biologia. São Paulo: Scipione; 1993.
2. Wood McKenzie. Agrochemical service: the world market in 2000. In: Annual review of the Crop Protection Association. Peterborough: Crop Protection Association; 2001.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [Homepage da Internet]. Brasília: [Homepage da Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
4. Meister RT, editor. Farm chemical handbook '99. Wlloughby: Meister Publishing Company; 1999.
5. Ecobichon DJ. Our changing perspectives on benefit and risks of pesticides: a historical overview. *Neurotoxicology*. 2000;21:211-8.
6. Forget G, Goodman T, deVilliers A, editors. Impact of pesticides use on health in the developing countries. Ottawa: International Development and Research Center; 1993.
7. Cameron G, Burgess F. The toxicity of 2,2-bis (pchlorophenyl) 1,1,1-trichloroethane (DDT). *Br Med J*. 1945;1:865-87.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from:[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)  
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.



8. Hayes WJ, Durham WF. The effect of know repeated oral doses of chlorophenoethane (DDT) in man. *JAMA*. 1956;162:890-7.
9. Ratcliffe D. Changes attributable to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds. *J Appl Ecol*. 1970;7:67-115.
10. Ramade F. *Ecotoxicology*. New York: John Wiley & Sons;1987.
11. Pearce N, Reif JS. Epidemiologic studies of cancer in agricultural workers. *Am J Ind Med*. 1990;18:133-48.
12. International Agency for Research on Cancer (IARC). WHO International Life Sciences Institute. Occupational eposures in insecticide application and some pesticides. *IARC Mongr Eval Carcinog Risks Hum*. 1991;53:612.
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n0. 04/DISAD/MS, de 30 de abr 1980 [Homepage da Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. [Acesso em 20 Jul 2005]. Disponível em: <http://www.e-legis.bvs.br/leisref/public>.
14. World Health Organization. WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-01. Geneva: World Health Organization; 2001 (Document reference WHO/PCS/01.4).
15. Hanke W, Jurewicz J. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an

- 
- onverview of current epidemiological evidence. *Int J Occup Med Environ Health*. 2004;17:223- 43.
16. Jaga K, Dharmani C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer [Review]. *Rev Environ Health*. 2005;20:15- 38A.
  17. Perera FP. Environment and cancer. Who are susceptible? *Science*. 1997;278:1068-107.
  18. Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective [Review]. *Mutat Res*. 2003;544:305-11.
  19. Garcia EG. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. São Paulo: FUNDACENTRO; 2001.
  20. World Health Organization. Public impact of pesticides used in agricultura. Geneva: WHO; 1990.
  21. Organização Pan-americana da Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária; 1996.
  22. Giacomazi S, Cochet N. Environmental impact of Diuron transformation: a review. *Chemosphere*. 2004;56:1021-32.
  23. Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Griffith SM, Wigington PJ. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J Environ Qual*. 2003;32:171-9.
  24. Okamura H, Aoyama I, Ono Y, Nishida T. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar Pollut Bull*. In press 2003.

- 
25. Verheij ER, van der Greef J, La Vos GF, van der Pol W, Niessen WM. Identification of Diuron and four of its metabolites in human postmortem plasma and urine by LC/MS with a moving-belt interface. *J Anal Toxicol.* 1989;13:8-12.
  26. Wittke K, Hajimiragha H, Dunemann L, Begerow J. Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 55(1-2):215-28.
  27. Boyd EM, Krupta V. Protein deficiency diet and Diuron toxicity. *J Agric Food Chem* 1970;18:1104-7.
  28. Hayes WJ, JR.. *Pesticides studied in man.* Baltimore, Williams & Wilkins, 1982.
  29. Nagasaki H, Tomi S, Mega T, Marugami M, Ito N. Development of hepatomas in mice treated with benzene hexachloride. *Gann.* 1971; 62:431.
  30. Munir KM, Soman CS, & Bhide SV. Hexachlorocyclohexane-induced tumorigenicity in mice under different experimental conditions *Tumori.* 1983;69:383-6.
  31. Worthing CS. *The pesticide manual,* British Crop Protection Council, Lavenham Press, Suffolk, 1993;339.

- 
32. Khera KS, Whalen C, Trivett G. and Ongers G. Teratogenicity studies on pesticide formulations of dimethoate, Diuron, and lindane in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1979; 22: 522.
  33. Hodge HC, Downs WL, Panner B, Smith D, Maynard E, Clayton J, Jr and Rhodes R. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 1967; 5: 513.
  34. Grutman G, Schoofs L, Lontie JF, Van Larebeke N. The mutagenicity in procaryotes of herbicides. *Residue Rev.* 1984;91:1-46.
  35. Seiler JP. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat Res.* 1978;58:353.
  36. Annon. *Dang Proper Ind Mater Rep.* 1987;7:49.
  37. Dupont de Nemours & Co. Mutagenicity studies with Diuron. Salmonella test, No. HLR 471-84 (7185); CHO/HGPRT forward gene mutation assay, H.R. No. 282-85 (06/28/85); unscheduled DNA synthesis test in primary rat hepatocytes, HLR No. 349-85; and in vivo cytogenetic test, No. 36685. Wilmington; 1985.
  38. Agrawal RC, Kumar S, Mehrotra NK. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. *Toxicol Lett.* 1996;89:1-4.
  39. Agrawal RC, Mehrotra NK. Effect of Diuron on germ cells of mice. *Indian J Exp Biol.* 1997;35:1256-7.

- 
40. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with NMR1 mice (administration in the diet for up to two years). Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology; 1983.( DPR # 106-048)
  41. Bayer Institute of Toxicology. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years).Wuppertal: Bayer Institute of Toxicology; 1985. (DPR # 106-035)
  42. U.S Environmental Protection Agency (USEPA). Carcinogenicity Peer Review of Diuron. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Memorandum from Linda Taylor and Esther Rinde to Phillip Errico, 8. Washington; 1997.
  43. Antony M, Shukla Y, Mehrotra NK. Tumor initiatory activity of a herbicide Diuron on mouse skin. *Cancer Lett.* 1990;16;52:161.
  44. Agrawal RC, Kumar S. Hepato-toxic effect of Diuron in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 1999;37:503-4.
  45. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Mechanisms of carcinogenesis. FASEB J.* 1991;5:2280-6.
  46. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 1991;51(suppl):5023-44.
  47. Pitot HC. A molecular biology of carcinogenesis. *Cancer Res.* 1993;72:962-70.
  48. Grasl-Kraupp B, Luebeck G, Wagner A, Löw-Baselli A, Gunst M, Waldhör T, et al. Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role

- 
- of cell replication and cell death (apoptosis). *Carcinogenesis*. 2000;21:1411-21.
49. Satoh K, Hatayama I. Anomalous elevation of glutathione S-transferase P-form (GST-P) in the elementary process of epigenetic initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 2002;23:1193-8.
50. Finnberg N, Silins I, Stenius U, Hogberg J. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. *Carcinogenesis*. 2004; 25:113-22.
51. Moore MA, Nakagawa K, Satoh K, Ishikawa T, Sato K. Single GST-P positive liver cells – putative initiated hepatocytes. *Carcinogenesis*. 1987;8: 483-6.
52. Hendrich S, Glauert HP, Pitot HC. The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital. *Carcinogenesis*. 1986;7:2041-5.
53. Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Bursch W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res*. 1990; 50:5127-35.
54. Bannasch P. Preneoplastic lesions as end-points in carcinogenicity testing I- Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*. 1986;7:689-95.
55. Pitot HC, Campbell HA, Maronpot R, Bawa N, Rizvi TA, Xu YH, et al. Critical parameters in quantification of stages of initiation, promotion,

- 
- and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol Pathol.* 1989;17:594-612.
56. Farber E, Sarma RSD. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Lab Invest.* 1987;56:4-22.
57. Enzmann H, Bannasch P. Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1987;8:1607-12.
58. Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer.* 1988;62:1676-9.
59. Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Weber E, Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 1989;17:617-29.
60. Bannasch P, Zerban H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, editors. *Mechanism of carcinogenesis in risk identification.* Lyon: IARC Scientific Publication; 1992. p.389- 427. (IARC Sci Publ, 116).
61. Bannasch P, Nehrbass D, Kopp-Schneider. A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. In: Miller AB, Bartsch H, Dragsted L, Vainio H, editors. *Biomarkers in cancer chemoprevention.* Lyon: IARC Scientific Publication; 2001. p. 223-40. (IARC Sci Publ, 154)

- 
62. Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch.* 1997;431:391-406.
  63. Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2003; 31:126-33.
  64. Butler WH, Hemsall V, Stewart MC. Histochemical studies on the early proliferating lesions induced in the rat liver by aflatoxin. *J Pathol.* 1981;133: 325-40.
  65. Hanigan MH, Pitot HC. Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1985;6:165-72.
  66. Satoh k, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sto K. purification, induction and distribution of placental glutathione transferase; a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:3964-8.
  67. Bannasch P, Moore MA, Klimek F, Zerban H. Biological markers of preneoplastic foci and neoplastic nodules in rodent liver. *Toxicol Pathol.* 1982; 10:19-34.
  68. Ito N, Imaida T, Hasegawa R, Tsuda H. Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 1989; 19:385-415.



- 
69. Dragan YP, Rizui T, Xu Y-H. An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. *Fund Appl Toxicol.* 1991;16:525-47.
  70. Solt D, Faber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature.* 1976;263:701-3.
  71. Soma Y, Satoh K, Satoh K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of liver glutathione S-transferase in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. *Biochem Biophys Acta.* 1986;869:247-58.
  72. Imai T, Masui T, Ichinose M, Nakanishi H, Yanai T, Masegi T, et al. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remolding nodules in rat liver by in situ hybridization. *Carcinogenesis.* 1997;18:545-51.
  73. Steinmetz KL, Pogribny IP, James SJ, Pitot HC. Hypomethylation of the rat glutathione S-transferase  $\alpha$  (GSTP) promoter region isolated from methyl-deficient livers and GSTP-positive liver neoplasms. *Carcinogenesis.* 1998;19:1487-94.
  74. Satoh K, Hatayama I, Tsuchida S, Sato K. Biochemical characteristics of a preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form (7-7). *Arch Biochem Biophys.* 1991;285:312-6.
  75. Satoh K. Weak electrophile selective characteristics of the rat preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form, GSTP (7-7): a theory of

- 
- linear free energy relationship for evaluation of the active site hydrophobicity of isoenzymes. *Carcinogenesis*. 1998;19:1665-71.
76. Satoh, K. Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*. 1988;79:556-72.
77. Morrison HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D. Herbicides and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84:1866-74.
78. Weisenburger D. Perspective in pathology: human health effects of agricultural use. *Hum Pathol*. 1993;24:571-6.
79. Hakoi K, Cabral R, Hoshiya T, Hasegawa R, Shirai T, Ito N. Analysis of carcinogenic activity of some pesticides in a medium-term liver bioassay in the rat. *Teratog Carcinog Mutag*. 1992;12:269-76.
80. Ferrer A, Cabral R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Addit Contam*. 1991;8:755-76.
81. Hoshiya T, Hasegawa R, Hakoi K, Cui L, Ogiso T, Cabral R, et al. Enhancement by non-mutagenic pesticides of GST-P positive hepatic foci development initiated with diethylnitrosamine in the rat. *Cancer Lett*. 1993; 72:59-64.
82. Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, et al. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats; an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*. 1988;9:387-94.

- 
83. Hasegawa R, Ito N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 1992;30:979-92.
  84. 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.* 1997;25:453-60.
  85. Ito N, Hasegawa R, Cabral JRP. Medium-term in vivo bioassays for carcinogenicity of pesticides. In: Roe RM, Kuhr RJ, editors. *Review of pesticides toxicology.* Raleigh: Toxicology Communications Inc.; 1993. p. 115-32.
  86. Cabral R, Hoshiya T, Hakoï K, Hasegawa R, Ito N. Medium-term bioassay for the hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene. *Cancer Lett.* 1996;100: 223-6.
  87. Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Kurata Y, Hagiwara A, Shirai T. Effects of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:159-63.
  88. Ito N, Hagiwara A, Tamano S, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, et al. Lack of carcinogenicity of pesticide mixtures administered in the diet at acceptable daily intake (ADI) dose levels in rats. *Toxicol Lett.* 1995;82/83:513-20.

89. Ito N, Imaida K, Hirose M, Shirai T. Medium-term bioassay for carcinogenicity of chemical mixtures. *Environ Health Perspec.* 1998;106(suppl 6):1331-6.
90. International Agency for Research on Cancer(IARC). WHO International Life Sciences Institute. The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. Consensus report. *IARC Sci Publ.* 1999;(146):1-18.
91. Ito N, Tamano S., Shirai T. A medium-term rat liver bioassays for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003;94. 3-8.

*Objetivo*

---

### 3. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi:

Caracterizar a possível atividade hepatotóxica e hepatocancerígena (promotora) do pesticida Diuron em modelo de hepatocarcinogênese de média-duração para ratos, que utiliza como parâmetro o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas que expressam a enzima glutathione S-transferase (GSTP), forma placentária.

*Capítulo II*

*Manuscrito*

---

**Avaliação da carcinogenicidade do pesticida Diuron [3(3,4-  
diclorofenil) 1,1, dimetil uréia] em modelo de carcinogênese de média  
duração para o fígado de ratos Wistar machos**

Tony Fernando Grassi<sup>1</sup>, João Lauro Viana de Camargo<sup>1</sup>, Luís Fernando Barbisan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN)- Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP.

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP.

Correspondência:

Luís Fernando Barbisan, PhD - Departamento de Morfologia Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, 18618-000, Brasil.

E- mail: [barbisan@ibb.unesp.br](mailto:barbisan@ibb.unesp.br)

Fone/Fax: (55) (14) 38116264

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena – TOXICAN e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) PQ 302361/2003-0.

*\*Manuscrito de acordo com as normas da revista Toxicology Letters (0378-4274)*



---

## Resumo

O presente estudo avaliou o potencial promotor do herbicida Diuron ([3(3,4-diclorofenil) 1,1, dimetil uréia]), sobre o desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas glutathione S-transferase positivas (focos GST-P<sup>+</sup>) em modelo *in vivo* de carcinogênese de média duração em ratos. Ratos Wistar machos foram distribuídos em onze grupos experimentais (n=15): no início do experimento, os grupos G1 a G5 e G6 a G11 receberam dose única i.p. de NaCl 0,9% (veículo) e de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg), respectivamente. A partir da segunda semana do experimento, os grupos G1 e G6 receberam ração basal e os grupos G2 a G5 e G7 a G10 ração basal acrescida com 125, 500, 1250 ou 2500 ppm de Diuron, ou 200 ppm de hexaclorobenzeno (HCB, controle positivo), respectivamente, até o final do experimento. Todos os animais foram submetidos a hepatectomia parcial de 70% na 3ª semana e a eutanásia na 8ª semana do experimento. Foram coletadas amostras de sangue (dosagens de alanina aminotransferase - ALT e creatinina) e de fígado, rins e baço (análise histológica). Foram analisados e comparados entre os grupos experimentais, o grau de hipertrofia centrolobular hepática (leve, moderada e intensa) e número e área agregada de focos GST-P<sup>+</sup>, identificados por reação imunohistoquímica. Houve diminuição do ganho de peso corpóreo nos grupos tratados com as concentrações de 1250 e 2500 ppm de Diuron, quando comparado com os respectivos grupos controles. O tratamento com o Diuron não alterou os níveis séricos de ALT e creatinina, mas induziu hemossiderose e aumento do peso relativo do baço (esplenomegalia) nas maiores concentrações de Diuron (1250 e

2500 ppm). Freqüência maior de animais com hipertrofia centrolobular leve foi observada nos grupos de animais tratados com 1250 e 2500 ppm de Diuron. Os grupos iniciados com a DEN e tratados com Diuron não diferiram com relação ao número e tamanho de focos GST-P<sup>+</sup>, quando comparados com o grupo de animais iniciados com a DEN. Os animais somente tratados com Diuron não desenvolveram focos GST-P<sup>+</sup>. Nas condições do presente experimento, os resultados indicam que o herbicida Diuron não apresenta atividade promotora da hepatocarcinogênese química.

**UNITERMOS:** Pesticidas, Hepatocarcinogênese química, Focos GST-P<sup>+</sup>, Diuron, Ratos.

**Abstract**

This study was developed to verify if the carcinogenic potential (promoter) of herbicide Diuron (3(3,4-dichlorophenyl) 1,1, dimethyl urea) could be detected by a medium-term alternative bioassay for carcinogenesis that uses the development of glutathione S-transferase positive (GST-P+) foci in the rat liver as the end-point. At the beginning of the experiment, male Wistar rats were allocated to eleven experimental groups (15 animals/group) in the following manner: groups G6 to G11 received a single i.p. injection of diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) to initiate liver carcinogenesis; groups G1 to G5 received one i.p. shot of NaCl 0,9% (vehicle of DEN). From the 2<sup>nd</sup> week, the animals were fed a basal diet (groups G1 and G6) or a diet added with Diuron at 125, 500, 1250 or 2500 ppm (groups G2-G5 and G8-G10) or with 200 ppm of Hexachlorobezene (HCB) (group G11, positive control) until the end of the experiment. All the animals were submitted to a 70% hepatectomy partial at the 3<sup>rd</sup> week and to euthanasia at the 8<sup>th</sup> week of experiment. Samples of peripheral blood (determination of alanine aminotrasferase – ALT – and creatinine), and of liver, kidney and spleen (histological analysis) were collected. Liver centrilobular hypertrophy (mild, moderate and severe) and the number and aggregated area of liver immunohistochemically identified GST-P+ foci were quantified and compared among the groups. In general, there was decreased gain of body weight, principally of 1250 and 2500 ppm Diuron-treated groups when compared to respective control groups. The herbicide did not alter ALT and creatinine serum levels but resulted in higher hemosiderosis and spleen

relative weight and in higher incidence of animals with centrilobular liver hypertrophy in 1250 and 2500 ppm Diuron-treated groups than the respective control groups. Diuron-treated groups did not differ regarding number and aggregate size of GST-P+ foci when compared to only DEN-initiated group. Animals not initiated with DEN, but fed with Diuron, developed no GST-P+ foci. Diuron did not promote the chemical hepatocarcinogenesis process as indicated by preneoplastic foci development within the conditions of the present experiment

Key words: Pesticides, Chemical Hepatocarcinogenesis, Foci GST-P<sup>+</sup>, Diuron, Rats.

## 1. Introdução

O Diuron, 3(3,4-diclorofenil) 1,1, (dimetil uréia)] CAS 330-54-1 (Figura 1) herbicida que pertencente à família da fenilamina e subclasse da feniluréia, vem sendo utilizado na agricultura para controle seletivo de plantas daninhas, gramíneas e musgos nas culturas de frutas, algodão, cana-de-açúcar, alfafa e trigo. Absorvido pelas raízes e folhas das plantas daninhas, o Diuron atua sobre o processo de fotossíntese pela inibição da produção de oxigênio e pelo bloqueio da transferência de elétrons ao nível do fotosistema II (Giacomazi & Cochet, 2004). Devido a sua alta persistência no ambiente (um mês a um ano), o Diuron pode ser encontrado em locais como solo, sedimentos e a água de superfície (Field et al., 2003; Okamura et al., 2003). Entretanto, no processo de degradação biótica ou abiótica do Diuron pode-se gerar compostos tóxicos, tais como a 3,4 dicloroanilina (3,4-DCA) (Giacomazi & Cochet, 2004).

Na literatura são encontrados poucos trabalhos sobre a avaliação do potencial mutagênico e/ou cancerígeno deste herbicida. O Diuron não mostrou atividade mutagênica na maioria dos testes *in vitro* com microrganismos, com ou sem ativação metabólica (Grutman et al., 1984). Entretanto, efeito mutagênico foi relatado em teste com *Salmonella typhimurium* com ativação metabólica, e em ensaios de biosíntese de DNA testicular (Seiler, 1978; Annon, 1987). O Diuron foi negativo em dois testes *in vitro* com células de mamíferos: o de mutação gênica em células de ovário de hamster chinês e o de síntese não programada de DNA (UDS) em hepatócitos de rato (Dupont de Nemours, 1985). Em testes *in vivo*, o Diuron

---

induziu a formação de micronúcleo em medula óssea de camundongos (Agrawal et al., 1996), mutações dominantes letais em camundongos Swiss (Agrawal & Mehrotra, 1997), além de efeitos clastogênicos em ratos (em teste citogenético *in vivo*) (Dupont de Nemours, 1985).

O potencial de carcinogenicidade do Diuron vem sendo reavaliado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) em decorrência de resultados positivos observado em estudos de longa-duração em roedores. Neste estudo realizado pela Bayer, este herbicida aumentou a incidência de alguns tipos de tumores em camundongos NMR1 e em ratos Wistar (Bayer, 1983, 1985 *apud* EPA, 1997). Em ratos, o Diuron administrado na ração (2500 ppm) por dois anos aumentou a incidência de pólipos e carcinomas de bexiga urinária tanto em machos como em fêmeas da linhagem Wistar; além disso, os ratos machos também apresentaram tendência ao aumento do desenvolvimento de pólipos e carcinomas da pelve renal (Bayer, 1985 *apud* EPA, 1997). Dois tumores renais, considerados raros para esta espécie, foram também observados em ratos Wistar machos expostos à maior concentração. As fêmeas de camundongos NMR1, expostas a três concentrações de Diuron na ração por 24 meses (25, 250 e 2500 ppm), apresentaram tendência ao aumento da incidência de carcinomas de mama quando expostas à maior concentração de Diuron. Esta incidência foi considerada maior do que os dados de incidência histórica deste tipo de tumor em fêmeas controle em estudos com a mesma linhagem de camundongos (Bayer, 1983 *apud* EPA, 1997).

O Diuron foi identificado como agente iniciador da carcinogênese de pele em camundongos (Antony et al., 1990). Agrawal & Kumar (1999) mostraram que o Diuron (2500 ppm na ração) não apresenta atividade carcinogênica para o fígado de ratos, ou seja, não induziu o aparecimento de tumores. Entretanto, esses autores não mencionaram a presença e/ou incidência de lesões hepáticas pré-neoplásicas nos grupos tratados com Diuron.

Dentre os protocolos de média duração propostos para o estudo da carcinogênese química, destacam-se os que utilizam o fígado como órgão-alvo. Devido à consistência dos resultados encontrados, estes protocolos baseados nos conceitos de iniciação e promoção da carcinogênese química vêm sendo utilizados como testes alternativos ou complementares ao teste de longa-duração em roedores para a detecção de cancerígenos químicos (Shirai, 1997; Ito et al., 2003).

O protocolo DEN-PH desenvolvido com dose única i.p. de 200 mg/kg de dietilnitrosamina (DEN) para iniciação da hepatocarcinogênese, associado a hepatectomia parcial e com duração de oito semanas, utiliza como parâmetro de avaliação o desenvolvimento de focos de hepatócitos alterados (FHA) que expressam a enzima glutationa S -transferase (GST-P), forma placentária (Shirai, 1997; Ito et al., 2003). Desta forma, a avaliação do potencial cancerígeno de uma substância-teste é feita pela análise quantitativa do número (focos/cm<sup>2</sup>) e da área agregada (mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>) de focos GST-P<sup>+</sup>. Este protocolo é delineado para a avaliação do potencial promotor de substâncias químicas, mostrando-se adequado para a avaliação da carcinogenicidade de pesticidas de forma isolada (Hakoi et al., 1992;

Hoshiya et al., 1993; Ito et al., 1993; Cabral et al., 1996) ou em misturas complexas em baixas doses (Ito et al., 1995a,b; 1998).

Desta forma, o presente projeto teve como objetivo, caracterizar a possível atividade hepatotóxica e hepatocancerígena (promotora) do pesticida Diuron em modelo de hepatocarcinogênese de média-duração para ratos, que utiliza como parâmetro o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas que expressam a enzima glutathione S-transferase (GSTP), forma placentária.



## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Animais e ambiente de experimentação**

Ratos Wistar machos com quatro semanas de idade foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas-SP (ver Anexo 1, pág. 74). Esses foram divididos em cinco animais por gaiola de polipropileno translúcido (41 x 34 x 16 cm) com tampa de arame cromado na forma de grade, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada (três trocas semanais) e alocados em sala de experimentação do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP campus de Botucatu. Durante toda a permanência dos animais nesse biotério as condições de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $55 \pm 10$  %), período de luz (ciclos de 12 horas claro /escuro, luz do tipo fluorescente) e exaustão de ar (seis períodos diários de uma hora) foram controladas. Os animais permaneceram em período de aclimação por duas semanas. Nesse período os animais foram avaliados clinicamente e pesados semanalmente. Ao final do período de aclimação os animais foram distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos experimentais.

Os procedimentos de manuseio, administração de drogas e forma de eutanásia dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo nº 368) (ver Anexo 2, pág.75).

## **2.2. Preparo da ração adicionada com Diuron ou Hexaclorobenzeno**

Os pesticidas Diuron (CAS 30-54-1, Sigma-Aldrich, EUA 98% de pureza) e Hexaclorobenzeno (HCB, CAS 118-74-1 Aldrich Chemical Company, Reino Unido, 99% de pureza) foram misturados à ração em pó NUVILAB-CR1 (Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba – PR) nas concentrações finais de 125, 500, 1250 e 2500 ppm e de 200 ppm, respectivamente. Após completa homogeneização e umidificação, realizada em misturador industrial (modelo CAF M60, - Rio Claro - SP) a ração foi peletizada em máquina industrial (Prensa Peletizadora Chavantes, Chavantes - PR), seca por ventilação e acondicionada em sacos plásticos previamente identificados e mantida sob refrigeração (-5°C) até o momento do uso.

## **2.3. Delineamento Experimental**

Após o período de aclimação, os animais foram divididos em onze grupos experimentais (15 ratos/grupo) (Figura 2). No início do experimento, os animais dos grupos G1 a G5 receberam dose única i.p. de NaCl 0,9% (veículo da DEN) e os grupos G6 a G11, dose única i.p. de dietilnitrosamina (DEN, 200 mg/kg) para iniciação da carcinogênese hepática. A partir da segunda semana do experimento, os animais receberam ração basal (grupos G1 e G6) ou ração basal acrescida com 125, 500, 1250 ou 2500 ppm de Diuron (grupos G2 a G5 e G7 a G10, respectivamente) ou 200 ppm do fungicida hexaclorobenzeno (HCB) (grupo G11, controle positivo) até o final da 8ª semana do experimento. Todos os animais

---

foram submetidos a hepatectomia parcial de 70% no início da 3ª semana e à eutanásia ao final da 8ª semana do experimento.

#### **2.4. Coleta de sangue e de órgãos selecionados**

Após anestesia dos animais com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corpóreo) foi feita a abertura cirúrgica das cavidades abdominal e torácica com a coleta sangue através de punção cardíaca. Após este procedimento, foi realizada a eutanásia dos animais através da secção dos vasos da base do coração.

As amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm por 10min, MSE Micro Centaur SANYO) para obtenção do soro (cerca de 400 µl). A análise bioquímica da alanina aminotransferase (ALT) e da creatinina foi feita utilizando-se Kits comerciais (SERA-PAK®, Bayer, França) e leitura fotométrica (COBAS MIRA S, Roche, Alemanha).

O fígado, rins e baço dos animais foram retirados, pesados e avaliados macroscopicamente. Amostras de fígado, rins e baço foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após o processamento histológico, cortes histológicos de 3 a 4 µm de espessura foram obtidos e utilizados para coloração com hematoxilina e eosina (HE) ou para reação imunoistoquímica pelo método do complexo avidina-biotina (ABC) (Hsu et al., 1981) (ver Anexo 3 e 4, págs. 76 a 81).

## **2.5. Análise histológica de órgãos selecionados**

Cortes histológicos de fígado, baço e rins corados pela HE foram analisados quanto à presença de alterações estruturais (lesões adaptativas ou não proliferativas/degenerativas, proliferativas ou pré-neoplásicas), utilizando-se de critérios bem estabelecidos pela literatura (IARC, 1990).

Em especial para o fígado, as lesões pré-neoplásicas ou os focos de hepatócitos alterados (FHA), menores que um lóbulo hepático, foram identificados e classificados como: focos de células claras, focos eosinofílicos, focos basofílicos, focos anfófilos e focos mistos, de acordo com critérios estabelecidos pela literatura (Bannasch & Zerban, 1990). Os FHA foram classificados de acordo com o tipo celular predominante (> 70% do foco) e a incidência de cada tipo determinada para cada grupo experimental. A presença de hipertrofia hepática centrolobular foi também verificada e sua intensidade determinada (leve, moderada ou intensa) (Kishima et al., 2000).

## **2.6. Análise imunoistoquímica e quantificação de focos GST-P<sup>+</sup>**

A detecção imunoistoquímica da expressão da enzima glutathione S-transferase forma placentária, (GST-P) (Grupos G1 a G11) e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Grupos G1 e G5) nos cortes histológicos do fígado seguiu as seguintes etapas principais: bloqueio da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, Merck, Alemanha), bloqueio de ligações inespecíficas (leite desnatado a 1%, Nestle, Brasil), incubação por doze horas a 4°C com anticorpo primário

policlonal anti-GST-P (classe IgG) (Medical & Biological Laboratories Co., Tóquio, Japão) ou anti-PCNA (classe IgG) (Dako, A/S, Dinamarca); incubação por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo (Vector Laboratories Inc., Dinamarca) e incubação por 45 min a temperatura ambiente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Dinamarca). Os sítios de marcação foram detectados por incubação com solução de 3,3'-diaminobenzidina a 0,038% (Sigma, EUA) e peróxido de hidrogênio a 0,025% (Merck, Alemanha) dissolvidos em PBS por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. A contra-coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris por cerca de 1 a 2 minutos. (ver Anexo 4, pág. 79).

Os focos GST-P<sup>+</sup> foram analisados utilizando-se de fotomicroscópio Nikon (Microphot-FXA) acoplado a um microcomputador, por meio do programa KS-300 (Kontron Elektronik, Alemanha). Com esse recurso, foram medidas a área de cada corte histológico do fígado (cm<sup>2</sup>), assim como a área de cada foco GST-P<sup>+</sup> com diâmetro maior ou igual a 0,15 mm<sup>2</sup> (Barbisan et al., 2003). Os parâmetros analisados foram: número de focos GST-P<sup>+</sup> por animal (focos/cm<sup>2</sup>) e área agregada de focos GST-P<sup>+</sup> para cada animal (mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>).

## **2.7. Análises de proliferação celular e apoptose**

Os níveis hepáticos de proliferação celular e apoptose (Grupos G1 e G5) foram determinados através dos cálculos dos índices de marcação pelo PCNA

(IM% PCNA - número hepatócitos PCNA positivos/número total de hepatócitos analisados x 100) e de apoptose (IA% - hepatócitos em apoptose e de corpos apoptóticos/número total de hepatócitos analisados x 100). Hepatócitos em apoptose (fases iniciais ou presença de corpos apoptóticos) foram identificados sob coloração de rotina de H&E de acordo com os critérios estabelecidos por Goldsworth et al., (1996). Para a determinação dos índices IM% PCNA e IA% foram analisados cerca de 2000 hepatócitos por animal. As análises de PCNA e de apoptose foram feitas utilizando-se de microscópio de luz convencional (ocular com retículo e objetiva de 40x, Carl Zeiss, Alemanha).

## **2.8. Análise estatística**

Toda as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se do Programa Jandel Sigma Stat® versão 2.0. Os dados de peso corpóreo, pesos absoluto e relativo dos órgãos e consumo de ração foram avaliados pelo teste da Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Aleatorizados (EIA) para amostras independentes. As análises das enzimas séricas ALT e creatinina e do número e área de focos GST-P<sup>+</sup> foram feitas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Os níveis de proliferação celular e apoptose no fígado foram feitos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A incidência dos diferentes tipos de FHA foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. A diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Período experimental

Alguns animais tratados com 2500 ppm de Diuron apresentaram alopecia na região torácica. Não foi observada mortalidade de animais em decorrência do tratamento com Diuron, entretanto, durante o período pós-operatório (hepatectomia parcial) ocorreram a morte de 11 animais (6,7%): 01 animal do grupo G2 (NaCl+125 ppm), 04 do grupo G4 (NaCl+1250 ppm), 02 do grupo G5 (NaCl+2500 ppm), 01 do grupo G8 (DEN+500 ppm) e 03 do grupo G11 (DEN+HCB).

#### 3.2. Consumo de ração basal e de Diuron

Durante o período de tratamento com o Diuron houve diminuição significativa ( $P < 0,001$ ) do consumo de ração basal nos grupos G4 (NaCl+1250 ppm), G5 (NaCl+2500 ppm), G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) quando comparado aos respectivos grupos controle (Tabela 1), cerca de -12% e -27% em relação ao grupo G1 (controle) e -8,5% e -19% em relação ao grupo G6 (DEN). A ingestão média de Diuron pelos animais foi cerca de 3,26 mg/rato/dia (9,77 mg/kg de p.c./dia), 13,16 mg/rato/dia (41,20 mg/kg de p.c./dia), 30,04 mg/rato/dia (101,53 mg/kg de p.c./dia), 51,92 mg/rato/dia (189,22 mg/kg de p.c./dia) para os grupos tratados com 125 (grupos G2 e G7), 500 (grupos G3 e G8), 1250 (grupos G4 e G 9) e 2500 ppm (grupos G5 e G10), respectivamente

---

(Tabela 1). Os dados de consumo médio de água pelos animais dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na seção Anexos (ver Anexo 5, pág. 82).

### **3.3. Peso corpóreo dos animais**

A partir da introdução do Diuron na ração, foi observado que os grupos expostos as maiores concentrações (1250 e 2500 ppm) apresentaram diminuição dos pesos corpóreos médios (Figura 3A e B). Ao final do período de exposição ao Diuron, os animais dos grupos G5 (NaCl+2500 ppm), G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) apresentaram pesos corpóreos menores ( $P < 0,001$ ) em relação aos respectivos grupos controle (Tabela 2), cerca de -21% em relação ao grupo G1 (Controle) e de -14% e -21% em relação ao grupo G6 (DEN), respectivamente. O ganho de peso corpóreo dos animais durante esse período foi menor ( $P < 0,001$ ) para os grupos G4 (NaCl+1250 ppm), G5 (NaCl+2500 ppm), G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) em relação aos respectivos grupos controle (Tabela 2), cerca de -19%, -53,5% em relação ao grupo G1 (controle) e de -28%, -44%, em relação ao grupo G6 (DEN), respectivamente.

### **3.4. Peso relativo dos órgãos**

Embora não estatisticamente diferente, os grupos G4 (NaCl+1250 ppm) e G5 (NaCl+2500 ppm) e os grupos G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) apresentaram valores médios maiores de peso hepático relativo em relação aos respectivos grupos controle (Tabela 3). Os animais do grupo G11



(DEN+HCB) apresentaram peso hepático relativo maior ( $P=0,039$ ) quando comparado ao grupo G6 (DEN) (Tabela 3). Em relação aos respectivos grupos controle, os animais dos grupos G5 (NaCl+2500 ppm) e G9 (DEN+1250ppm) apresentaram aumento do peso relativo dos rins direito e esquerdo ( $P < 0,019$ ;  $P < 0,003$ ) e do rim direito ( $P < 0,003$ ), respectivamente. Os animais do grupo G11 (DEN+HCB) apresentaram peso relativo menor para o rim esquerdo ( $P < 0,002$ ) em relação ao grupo G6 (DEN) (Tabela 3). Em especial, os grupos G4 (NaCl+1250 ppm) e G5 (NaCl+2500 ppm) ( $P < 0,001$ ) e os grupos G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) ( $P < 0,001$ ) apresentaram peso relativo do baço maior que os respectivos grupos controle (Tabela 3). Os dados de peso absoluto do fígado, rins e baço dos animais dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na seção Anexos (ver Anexo 6, pág.83).

### **3.5. Análise histológica e bioquímica**

No fígado, a hipertrofia centrolobular foi à alteração histológica mais freqüente (Tabela 4). Os grupos G4 (NaCl+1250 ppm) e G5 (NaCl+2500 ppm) ( $0,02 < P < 0,05$ ;  $0,04 < P < 0,001$ ) e os grupos G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) ( $0,02 < P < 0,05$ ;  $0,04 < P < 0,001$ ) apresentaram incidência maior de animais com hipertrofia centrolobular leve quando comparado com os respectivos grupos controle (Figura 4A e B, Tabela 4). O grupo G11 (DEN+HCB) apresentou incidência maior ( $0,01 < P < 0,001$ ) de animais com hipertrofia centrolobular moderada quando comparado ao grupo G6 (DEN) (Figura 4A e C,

---

Tabela 4). Um animal do grupo G10 (NaCl+2500 ppm) desenvolveu proliferação intensa de células ovais (Figura 4G).

Os animais dos grupos iniciados pela DEN desenvolveram FHA classificados como focos de células claras, eosinofílicas e basofílicas (Figura 4D - F, Tabela 5). A incidência dos diferentes tipos de FHA não foi alterada pelo tratamento com o Diuron (Tabela 5). Os animais do grupo 11 (DEN+HCB) apresentaram incidência maior ( $P < 0,011$ ) de focos eosinofílicos quando comparado ao grupo G6 (DEN) (Tabela 5). Raros FHA espontâneos foram observados nos grupos não-iniciados (grupos G1 a G5) (dados não mostrados).

Nos rins, foi observado frequência baixa de animais com alterações histológicas (Tabela 6, Figura 5A - G). A incidência destas lesões não foi diferente entre os grupos experimentais. Entretanto em relação ao baço, os grupos G4 (NaCl+1250 ppm) e G5 (NaCl+2500 ppm) e os grupos G9 (DEN+1250 ppm) e G10 (DEN+2500 ppm) apresentaram incidência maior de animais com esplenomegalia (macroscopia), congestão e aumento de hemosiderose na polpa vermelha, hemocitopoese extramedular e diminuição de nódulos linfáticos e de zona marginal na polpa branca (Figura 6A - D). Um animal do Grupo 6 (DEN) desenvolveu esplenomegalia associada à presença de linfoma (dado não mostrado).

O tratamento com Diuron não alterou os níveis séricos das enzimas ALT e creatinina (Tabela 7).

### 3.6. Análise quantitativa de focos GST-P<sup>+</sup>

O tratamento com Diuron não alterou o desenvolvimento (número e área agregada) dos focos GST-P<sup>+</sup> (Figura 4H) induzidos pela DEN. O grupo G11 (DEN+HCB) apresentou aumento significativo do número e área agregada ( $P < 0.001$ ) de focos GST-P<sup>+</sup> em relação ao grupo G6 (DEN) (Tabela 5). Raros FHA GST-P<sup>+</sup> espontâneos (menores que 0,15 mm de diâmetro) (Figura 4I) foram observados nos grupos não-iniciados (grupos G1 a G5) (dados não mostrados).

### 3.7. Análise de proliferação celular e apoptose no fígado

Para caracterizar uma possível alteração da cinética de crescimento dos hepatócitos pelo Diuron (efeito *per se*), índices de proliferação celular e de apoptose (Figura 7A e B) foram determinados apenas para os grupo G1 e G5. A marcação imunohistoquímica do antígeno PCNA (IM% PCNA) e a contagem de apoptose (IA%) no fígado dos animais não foram alterados pela exposição à maior concentração de Diuron (grupo G5, NaCl+2500 ppm) quando comparado com o respectivo grupo controle (grupo G1, NaCl) (Figura 8).

---

## 4. Discussão

O presente trabalho indica que o herbicida Diuron não apresenta atividade iniciadora ou promotora da hepatocarcinogênese química nas concentrações e período de exposição utilizados. Nossos resultados com enfoque em pré-neoplasia corroboram com achados de estudos sub-crônicos ou crônicos que indicam que o tratamento oral com Diuron não induziu o aparecimento de tumores hepáticos em ratos e cães (Hodge et al., 1967; Agrawal & Kumar, 1999).

Estudos experimentais indicam que o HCB, herbicida organoclorado, apresenta atividade promotora levando ao desenvolvimento de focos GST-P<sup>+</sup> em animais iniciados pela DEN (Cabral et al., 1996; Gustafson et al., 2000) ou de hepatocarcinomas quando administrado cronicamente a ratos iniciados ou não com a DEN (Stewart et al., 1989; Carthew & Smith, 1994). Em nosso estudo, o tratamento dos animais com HCB (controle positivo) promoveu o desenvolvimento de focos GST-P<sup>+</sup> (número e tamanho) iniciados pela DEN. Desta forma, o modelo de média duração DEN-PH para o fígado de ratos se mostra apropriado para avaliação do potencial cancerígeno de substâncias químicas que têm o fígado como órgão-alvo (organotropismo), correlacionando-se bem com resultados obtidos em testes de longa-duração (convencional) e apresentando poucos resultados falso-positivos ou falso-negativos (Ito et al., 2003).

Outros herbicidas da sub-classe das feniluréias substituídas e relacionados ao Diuron tais como o Linuron, Monuron e Isoproturon tem sido avaliados em testes de média e longa-duração em roedores, com respostas diferenciadas em relação ao

potencial hepatocancerígeno em ratos. Os herbicidas Linuron (150 mg/Kg/dia, i.g.) e Isoproturon (2000 ppm na ração) mostraram resultados negativo e positivo em teste de media-duração para o fígado de ratos Sprague-Dawley e Fischer, respectivamente (Hoshiya et al., 1993; Pasquini et al., 1994). Aumento na incidência de nódulos hepáticos ou de nódulos e carcinomas hepáticos combinados foram observado em ratos Fischer 344 expostos a dietas contendo 750 e 1250 ppm de Monuron (NTP, 1988).

Poucos são os trabalhos que investigaram a atuação do Diuron sobre etapas específicas do processo de carcinogênese química. Em relação à etapa de iniciação, o Diuron apresentou atividade iniciadora da carcinogênese de pele em camundongos com o desenvolvimento de papilomas quando administrado topicamente (nove aplicações, 250 mg/Kg) antes do tratamento com o promotor 12-O-tetradecanolil forbol 13-acetato (TPA) (Antony et al., 1990). Entretanto, o tratamento com Diuron não induziu o aparecimento de tumores hepáticos em ratos Wistar machos quando administrado na ração na concentração de 2500 ppm por quatro meses seguida pela administração do promotor hexaclorociclohexano (HCH) (Agrawal & Kumar, 1999). Em relação à etapa de promoção, ratos Wistar machos tratados com 500 ppm de Diuron na dieta por oito meses após iniciação com 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) não desenvolveram tumores hepáticos (Agrawal & Kumar, 1999). Entretanto, neste estudo faltou a presença de um grupo controle positivo tratado com 2 AAF/HCH.

Em nosso estudo, no grupo iniciado com a DEN e tratado com 2500 ppm de Diuron foi observado valores médios menores de número (-30%) e tamanho (-34%) de focos GST-P<sup>+</sup> quando comparado com o respectivo grupo controle (grupo G10 *vs.* grupo G6). Embora não exista diferença estatística, esta redução poderia ser decorrência da desnutrição dos animais (restrição alimentar média em torno de 18%). Em especial, a restrição calórica parece ser fator de inibição para o desenvolvimento de lesões pré e neoplásicas, espontâneas ou induzidas quimicamente, no fígado de ratos e camundongos (Lagolopoulos et al., 1991; Grasl-Kraupp, et al., 1994). Diminuição do consumo de ração de animais tratados cronicamente com dietas contendo 2500 e 5000 Diuron tem sido descrita em alguns casos no início do tratamento (Hodge et al., 1967).

Em estudos agudos, sub-crônicos ou crônicos de toxicidade oral do Diuron em ratos, as alterações hepáticas descritas foram restritas apenas ao aumento de pigmentação em células de Kupffer, necrose e esteatose hepatocítica (Hodge et al., 1967; Boyd & Krupa, 1970; Agrawal & Kumar, 1999). No presente estudo, foi observado que ambos os pesticidas HCB (200 ppm) e Diuron (1250 e 2500 ppm) induziram hipertrofia centrolobular hepática em grande parte dos animais tratados.

Esse resultado está associado ao fato destes pesticidas apresentarem atividade indutora de enzimas do sistema P450 hepático (Schoket et al., 1987; Schoket e Vincze, 1985, 1990; Thomas et al., 1998; Gustafson et al., 2000). Além disso, alguns autores demonstraram que o Diuron induziu aumento no conteúdo do citocromo P450 e da NADPH-citocromo redutase e a atividade das enzimas

---

benzo(a)pireno monooxigenase, 7-etoxicoumarina O-deetilase, aminopirina N-dimetilase, epóxido hidrolase, UDP-glicoroniltransferase e glutathione S-transferase (Schoket et al., 1987; Schoket e Vincze, 1985,1990). Tanto o HCB quanto o Diuron são indutores enzimáticos, entretanto o grau de hipertrofia centrolobular e o aumento de peso hepático relativo foi maior no grupo tratado com HCB. Neste último grupo foi nítida a presença de hepatócitos centrolobulares com cariomegalia e citoplasma aumentado e de aspecto vítrio, além de se observar muitos hepatócitos hipertróficos com marcação positiva para a GST-P (dado não mostrado). De fato, a expressão de GST-P em hepatócitos hipertróficos de animais tratados com HCB tem sido descrita e co-localizada com a expressão de CYP1A2, *c-fos* e *c-jun* (Thomas et al., 1998). Em nossas condições experimentais, o tratamento com Diuron não induziu hepatomegalia ou a expressão de GST-P em hepatócitos centrolobulares. Embora para algumas substâncias químicas não genotóxicas ou epigenéticas, incluindo-se alguns pesticidas como DDT, HCB, Dieldrin, exista uma associação entre hepatomegalia e indução enzimática (sistema de oxidases mistas ou P450) com atividade hepatocancerígena (Grasso et al., 1991) estas características conjuntas não se aplicam aos efeitos hepáticos decorrentes do tratamento com o Diuron.

O consumo médio de ração utilizado como base para calcular a ingestão média de Diuron mostra que os animais tratados com 125, 500, 1250 e 2500 ppm foram expostos em média a 0,29, 1,21, 3,0 e 5,6 %, respectivamente da DL<sub>50</sub> oral (3400 mg/kg) do Diuron em ratos (Hayes, 1982). Nos grupos expostos as maiores

concentrações (1250 e 2500 ppm) a redução do ganho de peso corpóreo foi em torno de 19% a 54%. Se levamos em consideração a dose máxima tolerada (DMT), que para estudos sub-crônicos (90 dias) pode ser calculada a partir da dose na qual ocorre redução do ganho de peso corpóreo igual ou superior a 10% (Reno, 1997), o tratamento com o Diuron nas concentrações de 1250 e 2500 ppm foi tóxico aos animais. Entretanto, o tratamento com Diuron nestas concentrações não levou à mortalidade de animais no decorrer do experimento. Da mesma forma, a alopecia na região do tórax observada em alguns animais tratados com a maior concentração de Diuron (2500 ppm) deve ser decorrente do contato com a ração (Antony et al., 1990).

Embora tenham sido expostos a doses estimadas bem abaixo da  $DL_{50}$ , os grupos expostos as maiores concentrações de Diuron (1250 e 2500 ppm) apresentaram redução do ganho de peso corpóreo acompanhada de redução do consumo de ração e esplenomegalia. De fato, diminuição de peso corpóreo, esplenomegalia, eritropoiese extramedular e diminuição dos valores de hematócrito e contagem de eritrócitos já foram descritas em trabalhos anteriores, especialmente em ratos expostos a rações contendo concentrações elevadas de Diuron (igual ou maior que 2500 ppm) (Hodge et al., 1967; Wang et al., 1993). É possível que a esplenomegalia observada em nosso estudo possa estar associada à congestão e ao aumento de hemosiderina, o que pode zser o resultado de um quadro de anemia hemolítica e meta-hemoglobinemia (Wang et al., 1993). Estes efeitos hematotóxicos do Diuron podem ser devidos à formação de adutos entre a hemoglobina e as



aminas aromáticas liberadas durante o metabolismo deste herbicida (Sabbioni & Neumann, 1990; Wang et al., 1993).

Em conclusão, os resultados indicam que o Diuron não apresenta atividade hepatocancerígena para ratos Wistar machos. Desta forma, o potencial cancerígeno do Diuron poderá ser caracterizado em outros órgãos-alvo tais como a bexiga e/ou mama de roedores, como indicado pelos resultados de testes de longa-duração (Bayer, 1983,1985 *apud* EPA, 1997).

---

## 5. Referências

1. Agrawal, R.C., Kumar, S., 1999. Hepato-toxic effect of Diuron in albino rats, Indian J. Exp. Biol. 37, 503-504.
2. Agrawal, R.C., Mehrotra, N.K., 1997. Effect of Diuron on germ cells of mice. Indian J. Exp. Biol. 35, 1256-1257.
3. Agrawal, R.C, Kumar S, Mehrotra N.K., 1996. Micronucleus induction by Diuron in mouse bone marrow. Toxicol. Lett. 89, 1-4.
4. Anon., 1987. Dang. Proper. Ind. Mater. Report, 7 (5) 49.
5. Anthony, M., Shukla, Y., Mehrotra N.K., 1990. Tumor initiatory activity of a herbicide Diuron on mouse skin. Cancer Lett. 16; 52(2), 161.
6. Bannasch, P., Zerban, H., 1990. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the liver. IARC Sci. Publ. 99, 199-240.
7. Barbisan, L.F., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Moreira, E.L.T., Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., da Eira, A.F., de Camargo, J.L.V., 2003. Agaricus blazei (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. Cancer Sc. 94, 188-192.
8. Bayer Institute of Toxicology, 1985. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with Wistar rats (administration in the diet for up to two years). Bayer Institute of Toxicology. DPR # 106-035.
9. Bayer Institute of Toxicology, 1983. Diuron: Study for chronic toxicity and carcinogenicity with NMR1 mice (administration in the diet for up to two years). Bayer Institute of Toxicology. DPR # 106-048.
10. Boyd, E.M., Krupta, V., 1970. Protein deficiency diet and Diuron toxicity. J. Agric. Food Chem. 18,1104-1107.
11. Cabral, R., Hoshiya, T., Hakoi, K., Hasegawa, R., Ito, N. 1996. Mediu-term bioassay for the hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene. Cancer Letter, 100, 223-226.

- 
12. Carthew, P., Smith, A.G., 1994. Pathological mechanisms of hepatic tumor formation in rats exposed chronically to dietary hexachlorobenzene. *Journal of Applied Toxicology*, Vol 14(6), 447-452.
  13. Dupont de Nemours & Co., 1985. Mutagenicity studies with Diuron. Salmonella test, No. HLR 471-84 (7185); CHO/HGPRT forward gene mutation assay, H.R. No. 282-85 (06/28/85); unscheduled DNA synthesis test in primary rat hepatocytes, HLR No. 349-85; and *in vivo* cytogenetic test, No. 36685.
  14. Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wigington, P.J., 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.* 32, 171-179.
  15. Giacomazi, S., Cochet, N.; 2004. Environmental impact of Diuron transformation: a review. *Chemosphere*, 56, 1021-1032.
  16. Goldsworthy, T.L., Conolly, R.B., Fransson-Steen, R., 1996. Apoptosis and cancer risk assesment. *Mutation Res.* 365, 71-90.
  17. Grasl-Kraupp, B., Bursch, F., Rettkay-Nedecky, B., Wagner, A., Lauer, B. Schulte-Hermann, R., 1994. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 995- 999.
  18. Grasso, P., Sharratt, M., Cohen, A.J., 1991. Role of persistent, non-genotoxic tissue damage in rodent cancer and relevance to humans. *Annu. Rev. Toxicol.* 31, 253-287.
  19. Grutman, G., Schoofs, L., Lontie, J.F. and Van Larebeke, N., 1984. The mutagenicity in prokaryotes of herbicides. *Residue Rev.* 91, 1.
  20. Gustafson, D.L., Long, M.E., Thomas, R.S., Benjamin, S.A., Yang, R.S., 2000. Comparative hepatocarcinogenicity of hexachlorobenzene, pentachlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene, and 1,4-dichlorobenzene:

- 
- application of a medium-term liver focus bioassay and molecular and cellular indices. *Toxicol. Sci.* 53(2), 245- 52.
21. Hakoi K., Cabral R., Hoshiya T., Hasegawa, R.; Shirai T.; Ito N. 1992. Analysis of carcinogenic activity of some pesticides in a medium-term liver bioassay in the rat. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 12, 269-276.
22. Hayes, W.J, JR., 1982. *Pesticides studied in man*. Baltimore, Williams & Wilkins.
23. Hodge, H.C., Downs, W.L., Panner, B., Smith, D., Maynard, E., Clayton, J., Jr. and Rhodes, R. 1967. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.*, 5, 513.
24. Hoshiya, T.; Hasegawa, R.; Hakoi, K., Cui, L., Ogiso, T., Cabral, R., Ito, N., 1993. Enhancement by non-mutagenic pesticides of GST-P positive hepatic foci development initiated with diethylnitrosamine in the rat. *Cancer Letters*, 72, 59-64.
25. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, N., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*; 29, 557-80.
26. International Agency for Research on Cancer (IARC) (WHO) International Life Sciences Institute, 1990. *Pathology of tumors in laboratory animals*. Vol 1, N° 99.
27. Ito N, Tamano S., Shirai T., 2003. A medium-term rat liver bioassays for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sc.* 94. 3-8.
28. Ito, N., Imaida, K., Hirose, M., Shirai, T., 1998. Medium-term bioassay for carcinogenicity of chemical mixtures. *Environ. Health Perspec.*, Vol 106, supplement 6. 1331-36

- 
29. Ito, N., Hasegawa, R., Imaida, K., Kurata, Y., Hagiwara, A., Shirai, T., 1995a. Effects of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 33, 159- 163.
  30. Ito, N., Hagiwara, A., Tamano, S., Hasegawa, R., Imaida, K., Hirose, M., Shirai, T. 1995b. Lack of carcinogenicity of pesticide mixtures administered in the diet at acceptable daily intake (ADI) dose levels in rats. *Toxicol. Lett.* 82/83, 513- 520.
  31. Ito, N., Hasegawa, R., Cabral, J.R.P., 1993. Medium-term *in vivo* bioassays for carcinogenicity of pesticides. In *Review of Pesticides Toxicology* (R.M. Roe and R.J. Kuhr, Eds.), pp. 115-132. Toxicology Communications Inc., Raleigh, NC.
  32. Kishima, M.O., Barbisan, L.F., Estevão, D., Rodrigues, M.A.M., de Camargo, J.L.V., 2000. Promotion of hepatocarcinogenesis by hexachlorobenzene in energy-restricted rats. *Cancer Letters*, 152, 37-44.
  33. Lagolopoulos, L., Sunahara, G.I., Würzner, H., Dombrowsky, I., Stalder, R., 1991. The effects of alternating dietary restriction and *ad libitum* feeding of mice on the development of diethylnitrosamine-induced liver tumors and its correlation with insulinaemia. *Carcinogenesis*, 12, 311-315.
  34. NTP, 1988. Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Monuron (CAS No. 150-68-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 226:1-166.
  35. Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y., Nishida, T., 2003. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Poll. Bull.* (in press).
  36. Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Dolara, P., Pampanella, L., Villarini, M., Caderni, G., Fazi, M., Fatigono, C., 1994. Assay of linuron and a pesticide mixture commonly found in the Italian diet, for promoting activity in rat liver carcinogenesis. *Pharmacol. Toxicol.* 75(3-4), 170-6.

- 
37. Reno, F.E., 1997. Carcinogenicity studies, in Sipes IG, McQueen, CA; Gandolf, A.J: (Eds.), Comprehensive Toxicology. Williams PD, Hottendorf GH (eds): Vol 2. Toxicological Testing and Evaluation. New York: Pergamon Press, pp 121-131.
  38. Sabbioni, G., Neumann, H.G., 1990. Biomonitoring of arylamines:hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides. *Carcinogenesis*, 11(1), 111-5.
  39. Schoket B., Vincze I., 1990. Dose-related induction of rat hepatic drug-metabolizing enzymes by Diuron and chlorotoluron, two substituted phenylurea herbicides. *Toxicol. Lett.* 50 (1), 1-7.
  40. Schoket, B., Zilahy, Z., Molnar, J., Vincze, I., 1987. Comparative investigation of antipyrine half-life and induction of cytochrome P-450 dependent monooxygenases in rats treated with phenylurea herbicides. *In Vivo*, 1(3), 185- 7.
  41. Schoket B., Vincze I., 1985. Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 56. 283-288.
  42. Seiler, J.P., 1978. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens. I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutat. Res.* 58, 353.
  43. Shirai, T., 1997. 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.* 25, 453-60.
  44. Stewart, F.P., Manson, M.M., Cabral, J.R., Smith, A.G., 1989. Hexachlorobenzene as a promoter of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in rats and comparison with induction of porphyria. *Carcinogenesis*, 10(7), 1225-30.
  45. Thomas, R.S., Gustafson, D.L., Ramsdell, H.S., El-Masri, H.A., Benjamín, S.A., Yang, R.S.H., 1998. Enhanced Regional Expresión of Glutathione S-Transferase P1-1 with Colocalized AP-1 and CYP 1<sup>a</sup>2 Induction in

- Chlorobenzene-induced Porphyria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, 22-31.
46. U.S Environmental Protection Agency (USEPA)., 1997. Carcinogenicity Peer Review of Diuron. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Memorandum from Linda Taylor and Esther Rinde to Phillip Errico, 8.
47. Wang, S.W.; Chu, C.Y., Hsu, J.D. and Wang, C.J., 1993. Haemotoxic effect of phenylurea herbicides in rats: role of haemoglobin-adduct formation in splenic toxicity. *Food Chem. Toxicol.* Vol 31, N° 4, pp. 285-295.

Tabela 1 - Consumo de ração basal e de Diuron pelos animais dos diferentes grupos experimentais.<sup>1</sup>

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>		Número efetivo de ratos	Consumo de ração <sup>3</sup> (mg/rato/dia)	Consumo de Diuron	
				(mg/rato/dia)	(mg/Kg/dia)
<b>Não-Iniciados</b>					
G1	NaCl	15	28,67 ± 2,38	-	-
G2	NaCl + 125 ppm	14	27,05 ± 1,48	3,38 ± 0,14	9,90 ± 1,70
G3	NaCl + 500 ppm	15	26,43 ± 1,65	13,46 ± 0,75	42,81 ± 7,40
G4	NaCl + 1250 ppm	11	25,24 ± 2,66*	31,37 ± 1,15	100,67 ± 11,25
G5	NaCl + 2500 ppm	13	21,04 ± 2,51*,**	50,19 ± 7,94	178,48 ± 29,02
<b>Iniciados</b>					
G6	DEN	15	23,60 ± 4,10	-	-
G7	DEN + 125 ppm	15	24,44 ± 4,89	3,14 ± 0,21	9,63 ± 2,18
G8	DEN + 500 ppm	14	23,98 ± 4,39	12,85 ± 1,12	39,59 ± 8,65
G9	DEN + 1250 ppm	15	21,53 ± 4,69*	28,71 ± 3,29	101,53 ± 24,74
G10	DEN + 2500 ppm	15	19,38 ± 3,40*,**	53,65 ± 3,11	199,95 ± 20,65
G11	DEN + HCB	12	24,91 ± 4,67	-	-

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de média ± SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.) e NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração. O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6. <sup>3</sup>2<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semanas do experimento.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G1 e G6, \*P < 0,001.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G4 e G9, \*\*P < 0,05.



Tabela 2 - Peso corpóreo inicial e final e ganho de peso corpóreo dos animais dos diferentes grupos experimentais<sup>1</sup>.

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>	Número efetivo de ratos	Peso Corpóreo (g)			
		Inicial	Final	Ganho de Peso <sup>3</sup>	
<b>Não-Iniciados</b>					
G1	NaCl	15	225,9 ± 25,33	399,93 ± 29,71	157,80 ± 22,61
G2	NaCl + 125 ppm	14	228,9 ± 24,38	402,57 ± 34,46	158,79 ± 27,16
G3	NaCl + 500 ppm	15	222,1 ± 17,64	389,42 ± 37,36	134,27 ± 19,99
G4	NaCl + 1250 ppm	11	221,3 ± 19,63	361,55 ± 26,06	127,18 ± 21,86*
G5	NaCl + 2500 ppm	13	227,4 ± 21,82	314,46 ± 33,75*	73,38 ± 22,55*,**
<b>Iniciados</b>					
G6	DEN	15	202,47 ± 16,24	386,67 ± 37,69	184,20 ± 31,46
G7	DEN + 125 ppm	15	207,53 ± 14,01	399,77 ± 26,33	192,24 ± 24,71
G8	DEN + 500 ppm	14	201,93 ± 14,33	388,66 ± 27,00	186,73 ± 20,35
G9	DEN + 1250 ppm	15	196,47 ± 18,06	329,29 ± 30,36*	132,82 ± 22,83*
G10	DEN + 2500 ppm	15	200,47 ± 13,20	303,84 ± 19,48*	103,37 ± 16,70*,**
G11	DEN + HCB	12	204,83 ± 13,20	397,13 ± 23,53	192,30 ± 24,76

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de média ± SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.) e NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração; <sup>3</sup>Período de exposição ao Diuron (2<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana do experimento). O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G1 e G6, \*P < 0,001.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G4 e G9, \*\*P < 0,05.

Tabela 3 - Pesos relativos de órgãos selecionados dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento<sup>1</sup>.

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>	Número efetivo de ratos	Peso relativo (%)				
		Fígado	Rim Direito	Rim Esquerdo	Baço	
<b>Não-Iniciados</b>						
G1	NaCl	15	3,29 ± 0,22	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,25 ± 0,03
G2	NaCl + 125 ppm	14	3,21 ± 0,23	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,25 ± 0,03
G3	NaCl + 500 ppm	15	3,25 ± 0,24	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,04
G4	NaCl + 1250 ppm	11	3,34 ± 0,23	0,34 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,41 ± 0,04***
G5	NaCl + 2500 ppm	13	3,44 ± 0,20	0,36 ± 0,03**	0,35 ± 0,01**	0,57 ± 0,07***,****
<b>Iniciados</b>						
G6	DEN	15	3,19 ± 0,34	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,08	0,30 ± 0,03 <sup>3</sup>
G7	DEN + 125 ppm	15	3,26 ± 0,19	0,33 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,04
G8	DEN + 500 ppm	14	3,25 ± 0,21	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,05
G9	DEN + 1250 ppm	15	3,39 ± 0,22	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,42 ± 0,06***
G10	DEN + 2500 ppm	15	3,33 ± 0,30	0,34 ± 0,02**	0,32 ± 0,03	0,56 ± 0,08***,****
G11	DEN + HCB	12	3,50 ± 0,29*	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,03**	0,30 ± 0,04

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de: média ± SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.), NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron na ração e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno na ração; <sup>3</sup> Na estatística do grupo controle não foi considerado um animal que apresentou esplenomegalia pela presença de linfoma. O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6.

Diferença estatística em relação ao grupo G6, \*P < 0,039.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G1 e G6, \*\*0,02 < P < 0,003, \*\*\*P= 0,001

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G4 e G9, \*\*\*\*P < 0,05.

Tabela 4 - Incidência (%) de alterações histológicas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/Tratamento <sup>1</sup>	Número efetivo de ratos	Alterações histológicas <sup>2</sup>							
		Hipertrofia		EF	FI	DC	HDB	HCO	
		Leve	Moderada						
<b>Não-Iniciados</b>									
G1	NaCl	15	0	0	1 (6,6%)	6 (40,0%)	0	0	0
G2	NaCl+125 ppm	14	4 (28,6%)	0	3 (21,4%)	6 (42,8%)	0	0	0
G3	NaCl+500 ppm	15	3 (20,0%)	0	0	7 (46,6%)	0	0	0
G4	NaCl+1250 ppm	11	4 (36,4%)*	0	0	3 (27,2%)	0	0	0
G5	NaCl+2500 ppm	13	7 (53,9%)**	0	0	2 (15,4%)	0	0	1 (7,7%)
<b>Iniciados</b>									
G6	DEN	15	2 (13,4%)	0	1 (6,6%)	7 (46,6%)	0	0	0
G7	DEN+125 ppm	15	4 (26,7%)	0	2 (13,3%)	8 (53,3%)	0	0	0
G8	DEN+500 ppm	14	6 (42,9%)	0	0	5 (35,7%)	0	1 (7,1%)	0
G9	DEN+1250 ppm	15	8 (53,4%)*	0	0	5 (33,3%)	1 (6,6%)	0	0
G10	DEN+2500 ppm	15	10 (66,7%)**	0	1 (6,6%)	9 (60,0%)	0	0	0
G11	DEN+HCB	12	3 (25,0%)	9 (75%)**	2 (16,6%)	6 (50,0%)	1 (8,3%)	0	0

<sup>1</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.) e NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron na ração e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno na ração; <sup>2</sup>EF= Esteatose microgoticular focal, FI= Foco de infiltrado inflamatório, DC= Degeneração cística, HDB= Hiperplasia de ductos biliares, HCO= hiperplasia de células ovais. O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6. Diferença estatística em relação ao grupo G1 ou G6, \* 0,02 < P < 0,05, \*\* 0,01 < P < 0,001.

Tabela 5 - Desenvolvimento de focos hepáticos alterados (fenotipagem e expressão de GST-P) nos animais dos grupos experimentais iniciados pela dietilnitrosamina.<sup>1</sup>

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>		Número efetivo de ratos	Incidência de focos de hepatócitos alterados <sup>3</sup>			Focos GST-P <sup>+</sup>		
			FCC	FCE	FCB	Número (foco/cm <sup>2</sup> )	Área Agregada (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	Total
G6	DEN	15	15 (100%)	4 (26,6%)	1 (6,6%)	9,37 ± 4,21	0,41 ± 0,24	335 (22,3) <sup>4</sup>
G7	DEN + 125 ppm	15	15 (100%)	10 (66,6%)	3 (20,0%)	10,32 ± 3,44	0,41 ± 0,10	423 (28,2)
G8	DEN + 500 ppm	14	13 (92,8%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)	9,21 ± 3,08	0,37 ± 0,24	334 (23,9)
G9	DEN + 1250 ppm	15	14 (93,3%)	7 (46,6%)	1 (6,6%)	9,46 ± 3,21	0,35 ± 0,17	360 (24,0)
G10	DEN + 2500 ppm	15	13 (86,6%)	10 (66,6%)	0	6,80 ± 2,58	0,27 ± 0,16	241 (16,1)
G11	DEN + HCB	12	11 (91,6%)	10 (83,3%)*	1 (83,3%)	15,27 ± 6,42**	0,82 ± 0,49**	444 (37,0)

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de média ± SD; <sup>2</sup> DEN = (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB = 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração; <sup>3</sup>FCC = foco de células claras, FCE = foco de células eosinofílicas e FCB = foco de células basofílicas; <sup>4</sup>Número médio de focos GST-P<sup>+</sup> por animal.

Diferença estatística em relação ao grupo G6, \*P< 0,011, \*\*P< 0,001.

Tabela 6 - Incidência (%) de alterações renais nos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupo/Tratamento <sup>1</sup>	Número efetivo de ratos	Alterações Renais										
		Atrofia Tubular		Dilatação Tubular		Hiperplasia Tubular		Hiperplasia Urotelial		Hidronefrose		
		Rim D	RIM E	Rim D	RIM E	Rim D	RIM E	Rim D	RIM E	Rim D	RIM E	
<b>Não-Iniciados</b>												
G1	NaCl	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	NaCl + 125 ppm	14	1 (7,1%)	0	0	2 (14,3%)	0	0	0	0	1 (7,1%)	0
G3	NaCl + 500 ppm	15	0	0	1 (6,6%)	1 (6,6%)	0	0	0	0	0	0
G4	NaCl + 1250 ppm	11	3 (27,2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G5	NaCl + 2500 ppm	13	1 (7,7%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	0	0	0	1 (7,7%)	0	0	0
<b>Iniciados</b>												
G6	DEN	15	1 (6,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	1 (6,6%)	0	0	0	0	0
G7	DEN + 125 ppm	15	2 (13,3%)	0	1 (6,6%)	1 (6,6%)	0	0	0	1 (6,6%)	1 (6,6%)	0
G8	DEN + 500 ppm	14	1 (7,1%)	2 (14,3%)	3 (21,45)	1 (7,1%)	0	0	0	0	0	1 (7,1%)
G9	DEN + 1250 ppm	15	0	2 (13,3%)	0	1 (6,6%)	0	0	0	0	0	0
G10	DEN + 2500 ppm	15	1 (6,6%)	0	2 (13,3%)	2 (13,3%)	1 (6,6%)	0	0	1 (6,6%)	2 (13,3%)	0
G11	DEN + HCB	12	1 (8,3%)	0	0	0	1 (8,3%)	0	1 (8,3%)	0	0	0

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de: média  $\pm$  SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.), NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron na ração e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno na ração.

Tabela 7 - Níveis séricos de creatinina e ALT (alanina aminotransferase) nos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do período experimental <sup>1</sup>.

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>		Número efetivo de ratos	Creatinina (mg/dl)	ALT (mg/dl)
<b>Não-iniciados</b>				
G1	NaCl	15	0,49 ± 0,03	70,60 ± 13,29
G2	NaCl + 125 ppm	14	0,50 ± 0,04	86,50 ± 25,99
G3	NaCl + 500 ppm	15	0,50 ± 0,03	86,20 ± 24,53
G4	NaCl + 1250 ppm	11	0,53 ± 0,08	83,18 ± 20,49
G5	NaCl + 2500 ppm	13	0,56 ± 0,06	79,15 ± 18,94
<b>Iniciados</b>				
G6	DEN	15	0,43 ± 0,17	53,07 ± 7,57
G7	DEN + 125 ppm	15	0,36 ± 0,09	51,47 ± 16,47
G8	DEN + 500 ppm	14	0,39 ± 0,09	56,64 ± 23,30
G9	DEN + 1250 ppm	15	0,34 ± 0,09	55,40 ± 17,93
G10	DEN + 2500 ppm	15	0,33 ± 0,12	62,53 ± 21,86
G11	DEN + HCB	12	0,33 ± 0,07	62,82 ± 28,65

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de: média ± SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.), NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração.

## Legendas para as Figuras

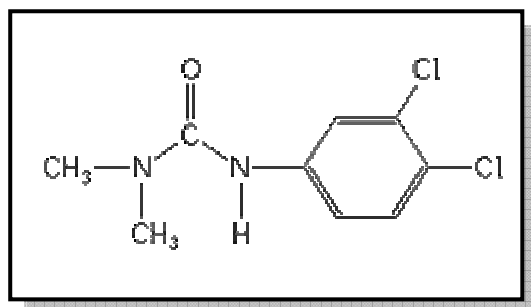
- Figura 1** - Estrutura molecular do herbicida Diuron.
- Figura 2** - Delineamento experimental (para detalhes ver item Material e Métodos).
- Figura 3** - Gráfico de evolução de peso corpóreo médio semanal. A) animais não-iniciados e B) animais iniciados. DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i,p.), NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração.
- Figura 4** - Cortes histológicos de fígado corados pela HE: sem alterações (animal do grupo G1) (A, 20x), com hipertrofia centrolobular leve (animal do grupo G8) (B, 20x) ou moderada (animal do grupo G11 (C, 20x). Focos de células claras, eosinofílicas e basofílicas (D – F, 40x). Proliferação de células ovais (animal do grupo G4) (G, 40x). Focos GST-P<sup>+</sup> identificados por reação imunoistoquímica (animal do grupo G7) (H, 40x) e mini-foco GST-P<sup>+</sup> (animal do grupo G1) (I, 40x)
- Figura 5** - Cortes histológicos de rim corado pela HE: Sem alterações (A, 5x); Com alterações - hidronefrose (B, 5x); Pelve Renal com urotélio normal (C, 20X); Pelve Renal com urotélio hipertrófico (D, 20x); Hiperplasia Tubular Atípica (E, 40x); Área de Atrofia Tubular (F, 10x) e Dilatação Tubular (G, 20x).
- Figura 6** - Macroscopia de Baço: Sem alterações (A); Baço com esplenomegalia (B); Cortes histológicos corados pela HE: Baço com aspecto histológico

normal (animal do grupo G1) (C, 10x) e com congestão e redução de polpa branca (nódulos linfáticos e de zona marginal) (D, 10x).

**Figura 7** - Cortes histológicos de fígado: Hepatócito em apoptose (corpos apoptóticos) (A, 100x, seta). Hepatócitos PCNA positivos (fase S) (B, 40 x, setas).

**Figura 8** - Índices de proliferação celular pelo antígeno PCNA (IM% PCNA) e de apoptose (IA %) nos grupos G1 (controle) e G5 (2500 ppm).





**Figura 1**

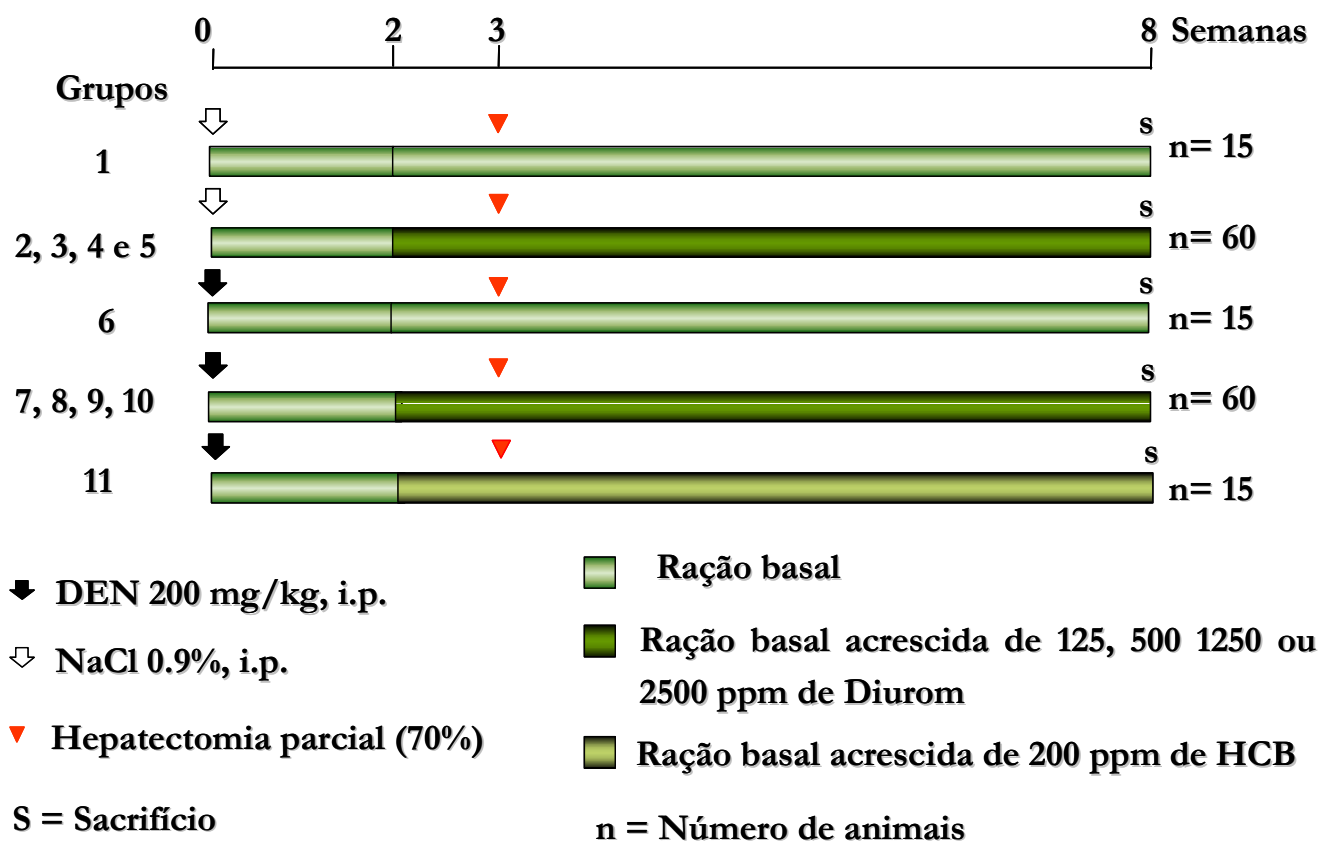
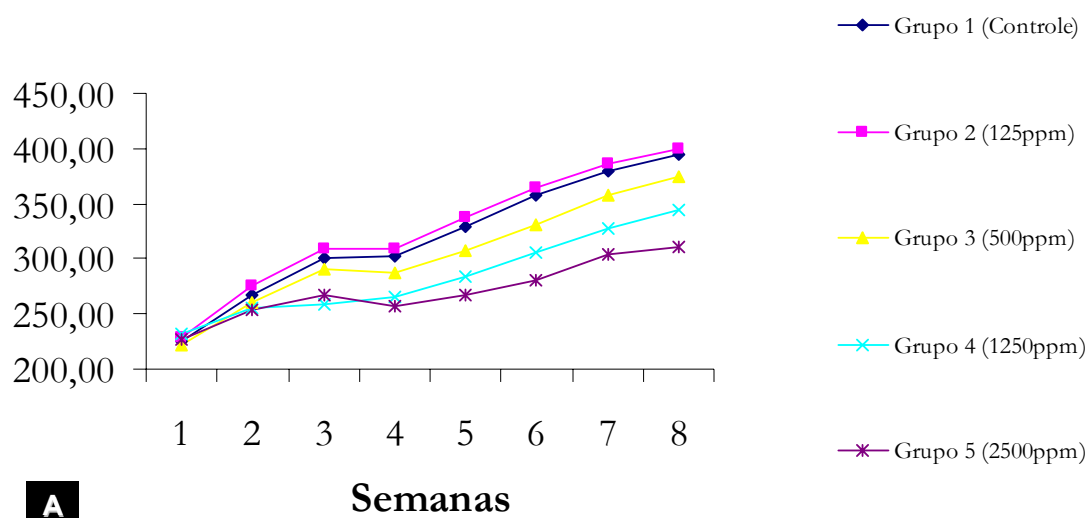


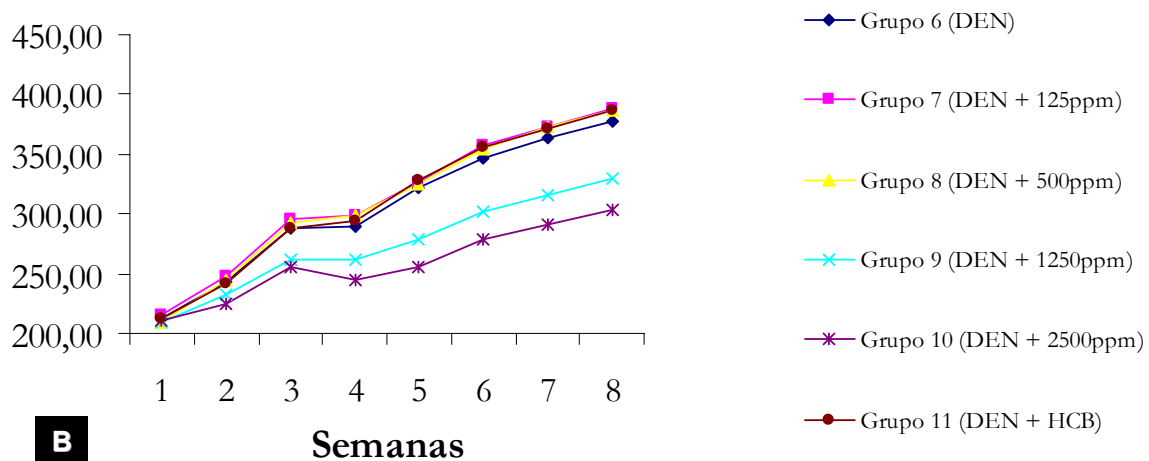
Figura 2

### Animais Não-Iniciados



**A**

### Animais Iniciados



**B**

## Figura 3

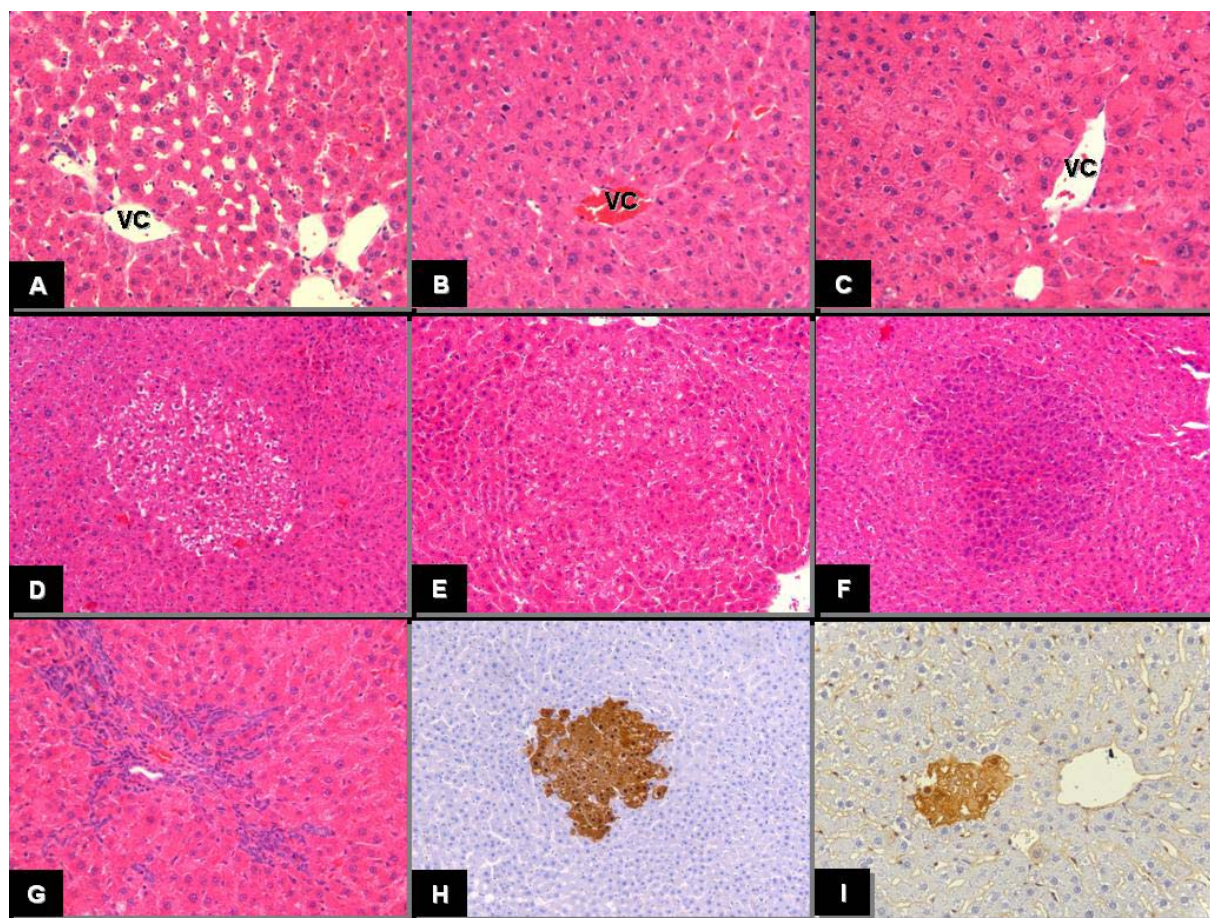
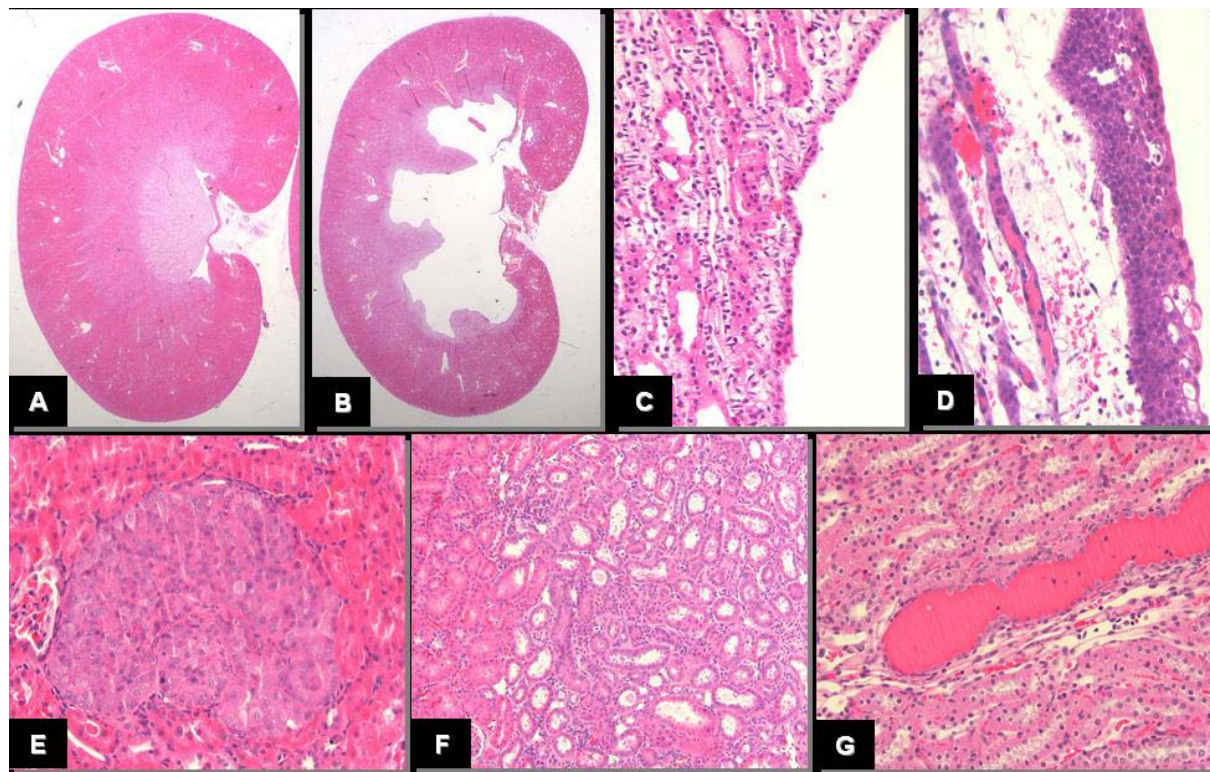
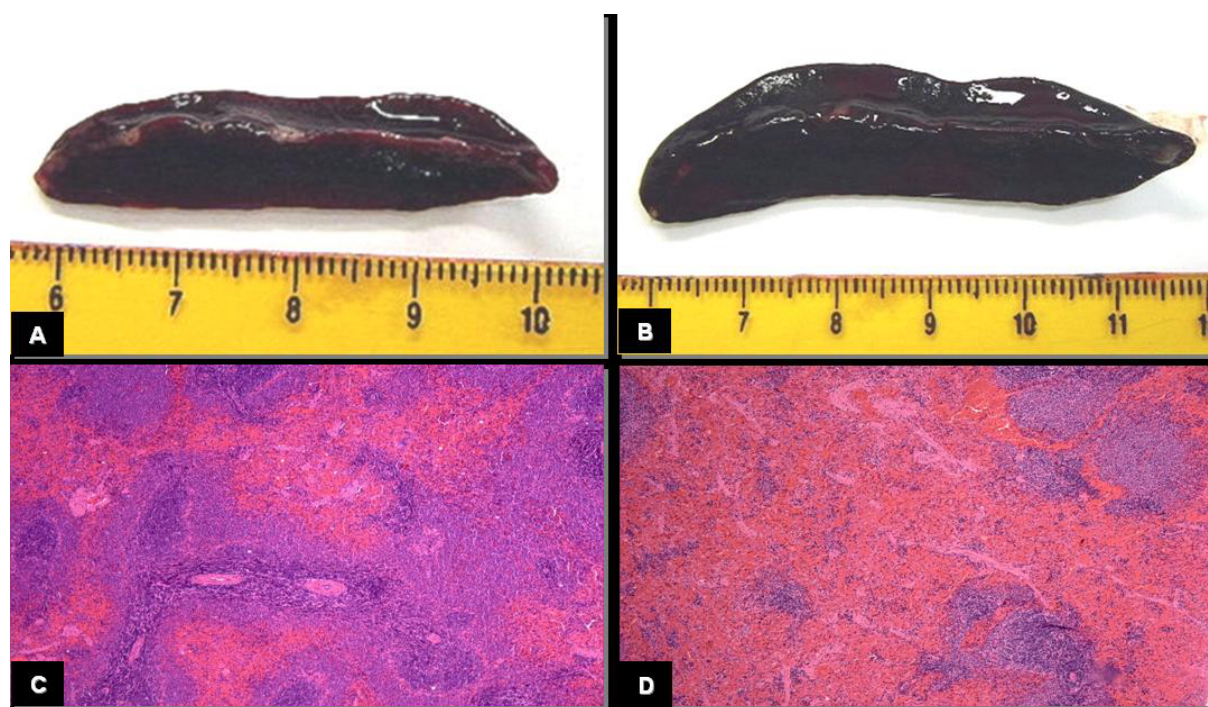


Figura 4



**Figura 5**





**Figura 6**

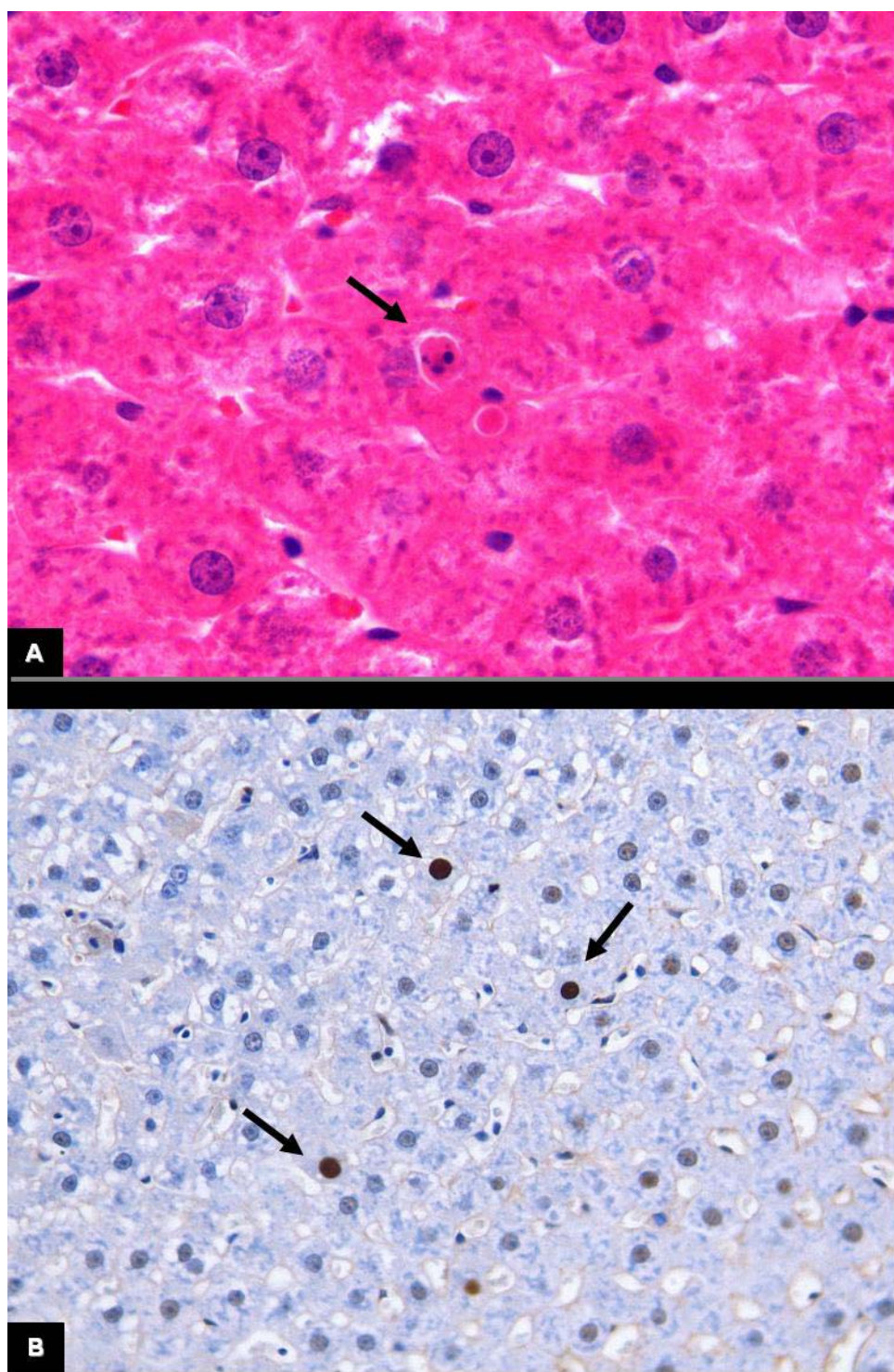
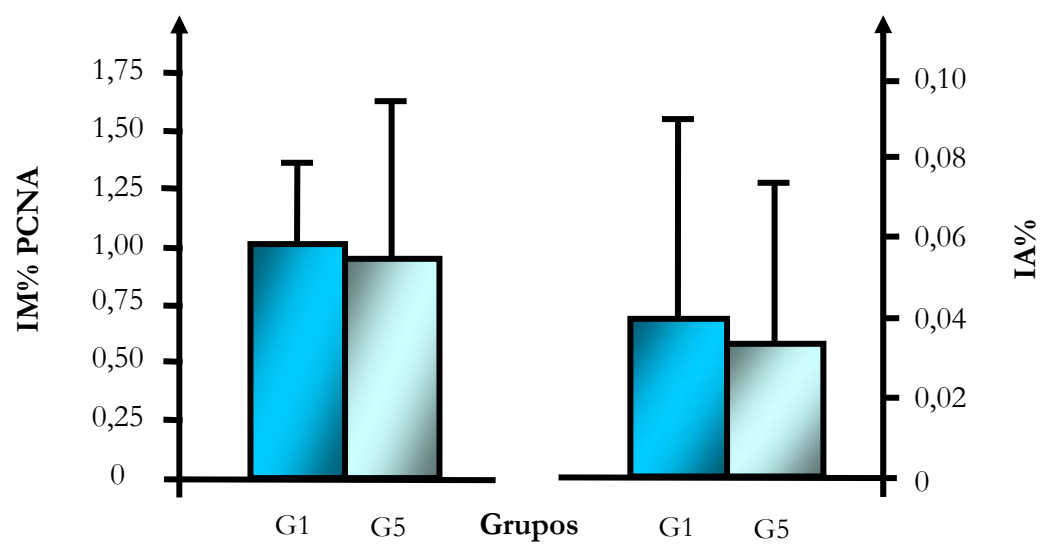


Figura 7





**Figura 8**

*Anexos*

---



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
CEMIB



ICLAS MONITORING / REFERENCE CENTER  
International Council for Laboratory Animal Science

Ilmo.  
Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN  
UNESP  
Campus de Botucatu – SP.

CERTIFICADO DE SANIDADE ANIMAL

Certificamos que os ratos da linhagem **WISTAR**, originários das colônias de Produção S.P.F. (bloco B1), apresentam-se isentos dos seguintes agentes patógenos, de acordo com os últimos testes de monitoração sanitária rotineiramente realizados pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária (\*):

1 - Ecto e Endoparasitas : *Radfordia sp, Poliplax sp, Ornithonyssus bacoti, Notoedres muris, Laelaps echidinus, Siphacia sp, Aspicularis tetraptera, Capillaria hepatica, Hymenolepis sp, Trichosomoides crassicauda, Trichuris muris, Taenia taeniaformis, Trichinella spiralis, Spironucleus muris, Giardia muris, Entamoeba muris, Tritrichomonas muris, Eimeria sp, Cryptosporidium sp, Toxoplasma gondii, Hexamastix muris, Trypanosoma lewisi.*

2 - Bactérias, Rickettsias e fungos : *Mycoplasma pulmonis, Mycoplasma arthritis, Mycoplasma neurolyticum, Clostridium piliforme (Bacillus piliformis), Salmonella sp, Shigella sp, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter rodentium, Citrobacter freundii* biotipo 4280, *Streptococcus β-hemolíticos grupo A, Streptococcus pneumoniae, Streptobacillus moniliformis, Corynebacterium kutscheri, Bordetella bronchiseptica, Pasteurella pneumotrópica, Leptospira sp, Hemobartonella muris, Eperythrozoon coccoides, Trichophyton sp (dermatofitos), Histoplasma capsulatum, Cryptococcus neoformans.*


3 - Vírus : Coronavírus do rato ( Rat Corona Virus - RCV e vírus da Sialodacrioadenite - SDAV ), parvovírus ( Kilhan rat virus - KRV, vírus Toolan H-1, vírus minuto do camundongo – MVM e Rat parvovírus – RPV ), vírus da encefalomielite de Theiler (TMEV), poxvírus do rato, vírus Sendai, vírus da Coriomeningite linfocitária ( LCM ), Reovírus tipo 3, Adenovírus murino tipo 1, Citomegalovírus murino (MCMV), Rotavírus grupo A/B (Edim/Idir), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus do Polyoma.

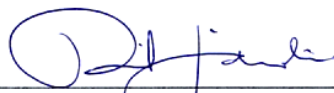
Informamos ainda que os mesmos se encontram livres de outros agentes infecciosos capazes de causar risco à saúde humana.

**ATENÇÃO** : para a manutenção do padrão sanitário descrito é fundamental que os animais sejam transportados em contêineres apropriados, que não devem ser abertos durante o transporte e que os animais sejam acondicionados em unidades isoladoras ou salas dotadas de sistema de barreiras adequadas para manutenção de animais S.P.F..

(\* data dos últimos testes realizados: Abril/2004.

Campinas, 22 de Junho de 2004.

  
Prof. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo  
Diretora do Cemib/Unicamp  
Fones : (0xx19)3788-7652 / 3788-7638  
E-mail : [guaraldo@cemib.unicamp.br](mailto:guaraldo@cemib.unicamp.br)

  
Prof. Dr. Rovilson Gilioli  
Diretoria de Controle de Qualidade Animal  
Seção de Controle de Qualidade Sanitária  
Fones : (0xx19) 3788-8272 / 3788-8273  
E-mail : [rovilson@unicamp.br](mailto:rovilson@unicamp.br)



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

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



Comissão de Ética em Experimentação Animal

## CERTIFICADO

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 368, sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da hepatocarcinogenicidade do pesticida diuron (3(3,4 diclorofenil), 1,1 dimetil uréia) em modelo de carcinogênese de média duração para o fígado de ratos**” sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan e João Lauro Vianna de Camargo**, com a colaboração de **Tony Fernando Grassi**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Projeto de pesquisa aprovado em 19 de novembro de 2.003

**Profª Drª Norma Sueli P. Modolo**  
Presidente da CEEA

**Alberto Santos Capelluppi**  
Secretário da CEEA

Foi apresentado pelo pesquisador em 24 de junho de 2004 – Certificado de Sanidade dos Animais fornecido pelo CEMIB DA UNICAMP.

## Processamento histológico

### Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

Ao sair do álcool 70%, os fragmentos hepáticos, renais e do baço (Figura 1) foram desidratados em banhos sucessivos em álcool 85%, álcool 95% e álcool absoluto (3 vezes) por uma hora cada. Os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III e banhados em parafina I, II e III por uma hora cada reagente. Nessa etapa utilizou-se o processador automático de tecidos (LEICA TP 1020, Alemanha). Após o processamento inicial, o material foi emblocado em parafina a 60°C no autoinfusor (LEICA EG 1160, Alemanha).

Cortes histológicos de espessura de 4 a 6µm foram obtidos em micrótomo (LEICA RM 2145, Alemanha). Os cortes histológicos foram colocados sobre as lâminas codificadas e essas levadas para estufa (FAMEN 002 CB, Brasil) a 60°C por 24 horas, a fim de se obter maior adesão dos cortes histológicos às lâminas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em suporte e levadas para coloração automática (LEICA XL, Alemanha). Neste processo, as lâminas passaram pelas seguintes etapas: bateria de hidratação (xilol I, II e III por 5 minutos em cada; álcool absoluto I, II e III por 8 segundos cada passagem; água corrente), lavagem em água corrente, hematoxilina de Harris por 5 minutos, diferenciador por 8 segundos, água amoniacal 8 segundos, álcool absoluto por 8 segundos e eosina por 2 minutos e bateria de desidratação (álcool I, II, III, IV e V por 8 segundos cada passagem).

---

Terminada a coloração as lâminas foram transferidas para outro suporte e levadas para a montagem automática (LEICA CV 5000, Alemanha) de lamínulas (24x32mm) em meio Permunt (FISHER, EUA). Após montagem, as lâminas histológicas foram rotuladas e identificadas. Todos os reagentes utilizados na coloração das lâminas foram obtidos da Merck (Alemanha).

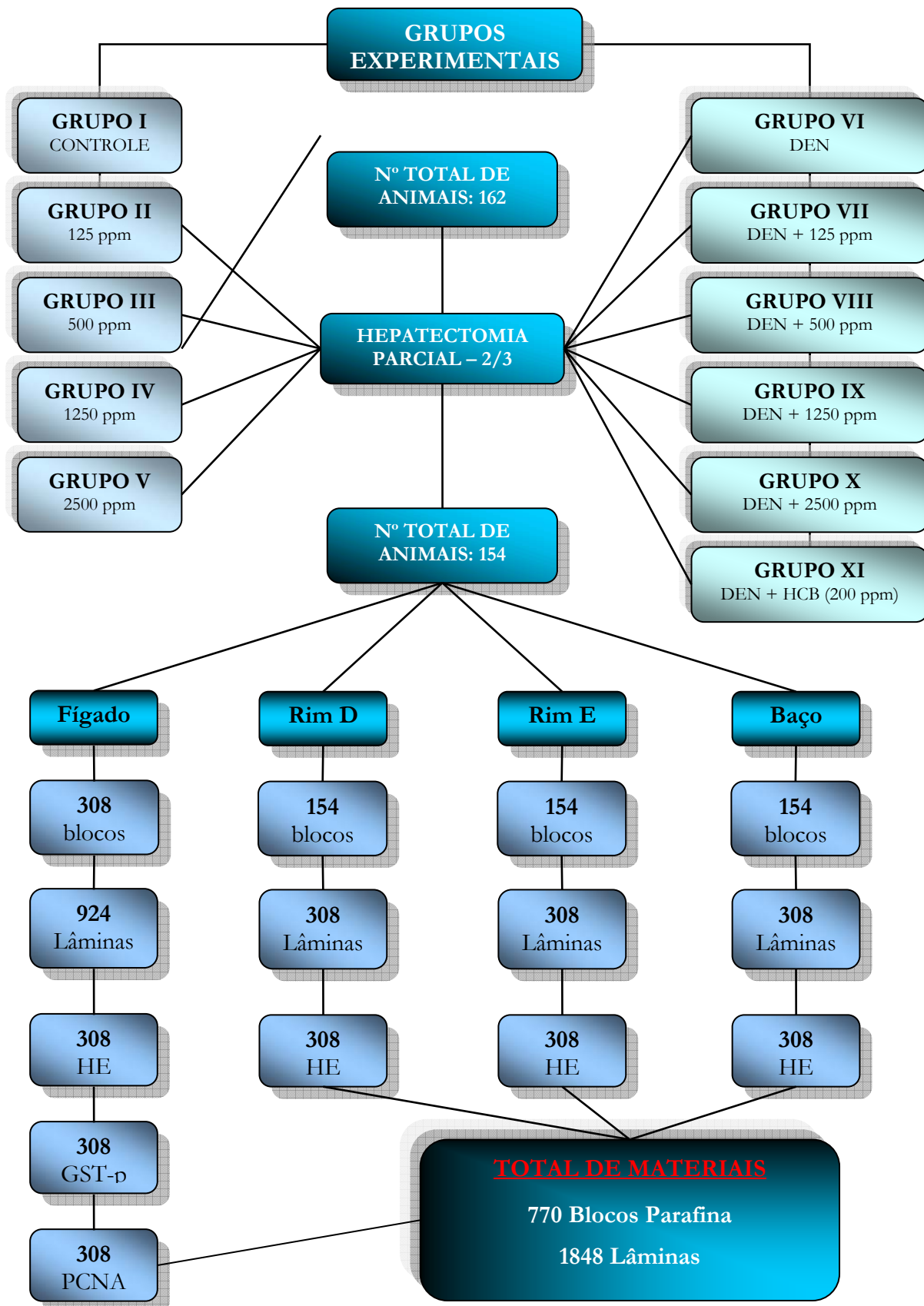


Figura 1. Processamento de amostras (órgãos) para o processamento histológico

## **Detecção imunohistoquímica de focos GST-P positivos e de núcleos PCNA positivos**

A expressão da enzima GST-P e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi detectada em cortes histológicos de fígado de 5 µm de espessura. Esses foram colocados sobre lâminas histológicas identificadas e pré-tratadas com solução de poly-D-lisina (Sigma Chemical CO, Mo, EUA) e após secagem em estufa (FAMEN 002C- Brasil) a 60°C por 12 horas passaram pelos seguintes procedimentos gerais:

1. Desparafinização, através de banhos em xilol (3vezes) 5 minutos cada;
2. Hidratação, realizada através da passagem do material por banhos sucessivos em álcool absoluto (3 vezes), álcool 95%, álcool 70% e água destilada;
3. Etapa de bloqueio de ligações inespecíficas: realizada mergulhando-se as lâminas em solução de leite desnatado a 1% em PBS por no mínimo 1 hora;
4. Incubação com anticorpo primário: foi aplicado de 100 a 200µl de anticorpo primário policlonal anti-GST-P (Medical & Biological Laboratories CO, Tokyo, Japão) (1:1000 em Albumina Bovina Sérica (ABS) a 1%) ou anticorpo primário monoclonal anti-PCNA (Clone PC10 - DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). A bandeja de imunohistoquímica (Shandon, EUA) foi fechada e deixada incubando em câmara úmida na geladeira à 4 °C “overnight”;
5. Incubação com anticorpo secundário (VECTOR, EUA): foi aplicado em cada corte histológico de 100 a 200 µl do anticorpo secundário anti-IgG de coelho



- biotilnilado (1:200 em ABS a 1%) para as reações de GST-P e anti-IgG de camundongo biotilnilado (1:200 em ABS a 1%) para as reações de PCNA , incubado por uma hora;
6. Bloqueio da peroxidase endógena: incubou-se as lâminas com  $H_2O_2$  a 3% em PBS, durante 5 minutos;
  7. Reagente ABC (VECTASTAIN Elite ABC KIT, VECTOR, EUA): o preparo foi feito adicionando igual volume (100 $\mu$ l) de solução A (avidina) e de solução B (biotina conjugada com peroxidase) em 5 ml de PBS. A solução permaneceu descansando por 30 min, antes de ser aplicada (cerca de 100 a 200  $\mu$ l/lâmina ). As lâminas foram submetidas à incubação por 45 minutos;
  8. Incubação com solução de 3'3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) (Sigma Chemical CO, MO, EUA): o preparo da solução foi feito colocando-se 3,75 mg de DAB em 10 ml de PBS e adicionado 2,5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  à 30% (a mistura dos componentes desta solução foi feita, obrigatoriamente, na seqüência em que aparece no texto e imediatamente antes do uso). Foram aplicados de 100 a 200  $\mu$ l/lâmina da solução DAB ativada em cada lâmina por 4 minutos;
  9. Contra-coloração com hematoxilina de Harris à 50%: após 1 minuto da aplicação da hematoxilina foi feita a lavagem em água corrente, em seguida, a passagem da lâminas em água amoniacal e, novamente, a lavagem em água corrente. A desidratação das lâminas foi realizada em álcool 70%, 95% e 100% (3vezes), e por passagem em xilol (3 vezes). Posteriormente, foi feita a

---

montagem das lâminas com lâminula (24x32mm) em resina sintética Permount (FISHER, EUA).

**OBS:** A partir da etapa 3 e com exceção da etapa 4, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos cada em solução de PBS 0,1M (solução fosfato tamponada, pH= 7,2). Entre as etapas o excesso da solução foi retirado com o compressor aspirador (Neuoni MB, Brasil).

Tabela 1 - Consumo de água dos animais dos diferentes grupos experimentais durante período experimental <sup>1</sup>

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>		Número efetivo de ratos	Consumo de água (ml/rato/dia)
<b>Não-Iniciados</b>			
G1	NaCl	15	36,13 ± 3,17
G2	NaCl + 125 ppm	14	35,56 ± 2,86
G3	NaCl + 500 ppm	15	33,83 ± 2,08
G4	NaCl + 1250 ppm	11	33,79 ± 3,24*
G5	NaCl + 2500 ppm	13	33,79 ± 5,52*
<b>Iniciados</b>			
G6	DEN	15	34,59 ± 5,43
G7	DEN + 125 ppm	15	35,73 ± 4,12
G8	DEN + 500 ppm	14	34,71 ± 5,06
G9	DEN + 1250 ppm	15	30,15 ± 4,55 **
G10	DEN + 2500 ppm	15	33,11 ± 5,41
G11	DEN + HCB	12	33,04 ± 4,33

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de média ± SD; <sup>2</sup>DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.) e NaCl 0,9% (veículo da DEN), 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno, ambos na ração. O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G1 e G6, \* P < 0,024 e \*\* P < 0,001, respectivamente.

Tabela 2 - Pesos absoluto de órgãos selecionados dos animais dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento<sup>1</sup>.

Grupos/Tratamento <sup>2</sup>	Número efetivo de ratos	Peso absoluto				
		Fígado	Rim Direito	Rim Esquerdo	Baço	
<b>Não-Iniciados</b>						
G1	NaCl	15	13,16 ± 1,40	1,28 ± 0,07	1,25 ± 0,08	1,01 ± 0,15
G2	NaCl+125 ppm	14	12,94 ± 1,52	1,31 ± 0,17	1,29 ± 0,12	1,00 ± 0,11
G3	NaCl+500 ppm	15	13,04 ± 1,60	1,28 ± 0,11	1,28 ± 0,10	1,15 ± 0,15
G4	NaCl + 1250 ppm	11	12,05 ± 1,28	1,25 ± 0,12	1,23 ± 0,09	1,54 ± 0,22*,**
G5	NaCl+2500 ppm	13	10,86 ± 1,64*	1,13 ± 0,15*	1,09 ± 0,10*	1,79 ± 0,31*
<b>Iniciados</b>						
G6	DEN	15	12,28 ± 1,34	1,17 ± 0,15	1,23 ± 0,27	1,13 ± 0,36
G7	DEN+125 ppm	15	13,02 ± 1,08	1,30 ± 0,14	1,21 ± 0,10	1,17 ± 0,19
G8	DEN+500 ppm	14	12,60 ± 0,99	1,28 ± 0,11	1,25 ± 0,12	1,33 ± 0,21
G9	DEN+1250 ppm	15	11,19 ± 1,48*	1,13 ± 0,11*	1,10 ± 0,11	1,39 ± 0,20*
G10	DEN+2500 ppm	15	10,12 ± 1,22*,**	1,02 ± 0,08*,**	0,98 ± 0,13*	1,71 ± 0,30*,**
G11	DEN+HCB	12	13,87 ± 1,12*	1,20 ± 0,20	1,15 ± 0,12	1,17 ± 0,15

<sup>1</sup>Valores apresentados na forma de: média ± SD; <sup>2</sup> DEN= (dietilnitrosamina, 200 mg/kg i.p.), NaCl 0,9% (veículo da DEN); 125, 500, 1250 e 2500 ppm de Diuron na ração e HCB= 200 ppm de hexaclorobenzeno na ração; <sup>3</sup> Na estatística do grupo controle não foi considerado um animal que apresentou esplenomegalia pela presença de linfoma. O grupo G11 foi comparado apenas com o grupo G6.

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G1 e G6, \* P < 0,001

Diferença estatística em relação aos respectivos grupos G4 e G9, \*\*P < 0,001.