

Proliferação celular na pelve renal de ratos expostos ao herbicida diuron ou ao adoçante artificial sacarina sódica

Oswaldo Luis Beneditoⁱ

Rafaela Marono Favaⁱⁱ

João Lauro Viana de Camargoⁱⁱⁱ

Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira^{iv}

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol11ed3.387>

Resumo

O herbicida diuron ou o adoçante Sacarina sódica (SNa) são substâncias não genotóxicas reconhecidas por induzirem carcinoma urotelial em ratos após dois anos de exposição a altas concentrações. Em períodos de 15 ou 20 semanas estas substâncias aumentaram a incidência de hiperplasia simples e o índice de proliferação celular na bexiga devido à citotoxicidade ou à abrasão. Uma vez que o trato urinário é revestido com urotélio, teoricamente o epitélio da pelve renal poderia desenvolver lesões proliferativas semelhantes. No entanto não há na literatura referência quanto a alterações do índice de proliferação celular do urotélio da pelve renal induzida pela exposição ao diuron ou a sacarina sódica. O objetivo desse estudo foi avaliar as taxas de proliferação celular (Índice de Marcação, IM) no urotélio da pelve renal de ratos expostos ao a diuron ou a SNa. Trinta e seis ratos Wistar machos foram alimentados ad libitum com dieta basal, SNa 710ppm ou diuron 2.500ppm por sete dias ou 15 semanas. Os rins foram processados para avaliação histológica e marcação imunoistoquímica pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Embora estatisticamente não significativa, a exposição a esses compostos aumentou a incidência de hiperplasia urotelial e o IM nos dois momentos avaliados comparados aos respectivos controles. Os resultados indicaram que a pelve renal responde de forma semelhante à bexiga a ação a esses agentes químicos podendo ser utilizada como sitio alternativo ou complementar para estudo de efeitos adversos de substancias potencialmente citóxicas para o urotélio.

Palavras-chave: Diuron. Sacarina sódica. Pelve renal. Índice de marcação. Urotélio.

Cell proliferation in the kidney pelvis of rats exposed to diuron herbicide or to sodium saccharin artificial sweetener

Abstract

The diuron herbicide or the sweetener sodium saccharin (NaS) are non-genotoxic substances recognized to induce urothelial carcinoma in rats exposed at high concentrations for two years. In 15 or 20 week periods these substances increased incidence of simple hyperplasia and cell proliferation in the rat urinary bladder urothelium due cytotoxicity or abrasion. Since the entire urinary tract is lined with urothelium, theoretically the kidney pelvis epithelium could develop

similar proliferative lesions. However, there are no references in the literature regarding to cell proliferation index changes of the kidney pelvis urothelium induced by diuron or sodium saccharin exposure. The aim of this study was to evaluate the cellular proliferation rates (labeling index, LI) in the urothelium of the kidney pelvis of rats exposed to diuron or NaS. Thirty-six male Wistar rats were fed ad libitum with basal diet, NaS 710ppm or diuron 2,500ppm for seven days or 15 weeks. The kidneys were processed for histological evaluation and immunohistochemical labeling by Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Although statistically not significant, these compounds increased the LI rates and the incidences of urothelial hyperplasia compared to the respective controls. The results indicated that the epithelium of the kidney pelvis responds in a similar way to that of the urinary bladder to the action to these chemical agents can be used as an alternative or complementary site for the study the adverse effects of potentially cytotoxic substances for the urothelium.

Keywords: Diuron. Sodium saccharin. Kidney pelvis. Labeling index. Urothelium.

Recebido em 14/05/2018 Aceito em 02/10/2018

1 INTRODUÇÃO

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida derivado da ureia utilizado em diversos tipos de culturas agrícolas para controle de ervas daninhas (OTURAN et al., 2008). O mecanismo de ação pelo qual o diuron atua neste controle ocorre através da inibição da fotossíntese impedindo a produção de oxigênio (USEPA, 1997). Devido suas propriedades físico químicas é altamente persistente, com meia-vida de um mês a um ano, podendo permanecer em muitos compartimentos ambientais como solo, água e água subterrânea (FIELD et al., 2003). Após dois anos de exposição à concentração de 2500ppm pela ração, ratos Wistar de ambos os sexos apresentaram carcinomas uroteliais na bexiga e pelve renal (USEPA, 1997; IYER, 2002). Conseqüentemente, esse herbicida foi classificado pela U.S. Environmental Protection Agency como “provável cancerígeno para a espécie humana” (USEPA, 1997). Estudos desenvolvidos em nosso laboratório indicaram que o modo de ação (MOA) cancerígeno do diuron na mucosa vesical do rato consiste de sucessivos eventos-chave que incluem a agressão citotóxica contínua do urotélio pelo herbicida e ou seus metabólitos levando a degeneração e esfoliação celular, visualizadas à microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 1, 3 ou 7 dias de exposição (DA ROCHA et al., 2013; FAVA et al.,

2015) e, finalmente, após 20 semanas de exposição, necrose seguida de hiperplasia regenerativa (DA ROCHA et al., 2010, 2012, 2013, 2014; CARDOSO et al., 2013, FAVA et al., 2015).

A sacarina sódica (SNa) é um adoçante sintético não calórico amplamente prescrito para diabéticos, desde a sua descoberta, seu uso tem sido controverso devido a capacidade de promover tumores na bexiga nas segundas gerações de ratos, após longos períodos de exposição oral a altas concentrações (COHEN et al., 1990, 1995; WHYSNER & WILLIAMS, 1996). Os sucessivos eventos-chave que constituem o MOA cancerígeno da SNa, diferente daqueles do diuron, iniciam-se com alterações da composição urinária (proteínas, eletrólitos e pH), seguidas de formação de sólidos urinários (principalmente fosfato de cálcio) que por microabrasão da mucosa urotelial superficial induzem necrose, esfoliação, aumento da proliferação celular, hiperplasias e, eventualmente tumores (COHEN et al., 1998; 2000; TURNER et al., 2001). Devido às diferenças entre homem e o rato quanto à composição urinária, os humanos não produzem esses sólidos urinários e, portanto, não são suscetíveis ao MOA cancerígeno da SNa (COHEN et al., 2008; SINGH, 2013).

Muitos marcadores imunoistoquímicos são utilizados para a avaliação da proliferação celular. Algumas proteínas nucleares participam efetivamente do processo de multiplicação celular e, por isso, podem ser utilizadas como marcadores específicos para a avaliação de alterações proliferativas do tecido. Neste cenário, a detecção e estimativa quantitativa dos marcadores 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), do antígeno nuclear associado ao ciclo celular (Ki-67) e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) pode contribuir para a avaliação de alterações relacionadas com o processo de divisão celular (MUSKHELISHVILI et al., 2003). O PCNA, proteína nuclear não-histona necessária ao funcionamento da enzima DNA-polimerase-delta nas fases G1 à M (FOLEY et al., 1991; MUSKHELISHVILI et al., 2003), tem sido amplamente utilizado na pesquisa clínica e experimental para estimativa da taxa da proliferação celular (índice de marcação, IM) em cortes histológicos. O uso do PCNA tem sido incentivado por não requerer injeção prévia de substâncias marcadoras exógenas; o que é necessário quanto ao uso do BrdU; e por ser de fácil detecção nas células em proliferação, visto que sua expressão está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular (MUSKHELISHVILI et al., 2003). Ainda que vários estudos de nosso grupo tenham utilizado o BrdU na detecção de alterações proliferativas do diuron ou da SNa (CARDOSO et al., 2013; FAVA et al., 2015) e o PCNA (NASCIMENTO et al., 2006) no urotélio da bexiga, não encontramos na literatura este tipo de avaliação no epitélio da pelve renal.

Em humanos, o carcinoma de células uroteliais (CCU) é o tumor maligno mais frequente na bexiga correspondendo a 95% dos casos de neoplasias neste órgão. Seu desenvolvimento tem sido relacionado com exposição a fatores biológicos (vírus e parasitas), ambientais (arsênio), ocupacionais (aminas aromáticas) e ao estilo de vida (tabagismo) (CRAWFORD, 2008; KIRILUK et al., 2012). O CCU pode ocorrer em diferentes topografias do sistema urinário, como bexiga, ureter e pelve renal (TYLER, 2012), estruturas que são revestidas pelo mesmo epitélio de transição (SOUZA et al., 2018). Portanto, cancerígenos químicos para a bexiga também podem induzir alterações proliferativas na pelve do rim. Essas considerações são válidas para o homem e para animais de experimentação, como roedores, que, com pequenas diferenças, têm a morfologia do sistema urinário basicamente similar (OYASU, 1995).

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações proliferativas no urotélio da pelve renal de ratos expostos à sacarina sódica 710ppm ou ao diuron 2500ppm por sete (07) dias ou 15 semanas pela histologia e estudo imunoistoquímico do índice de marcação pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).

3 METODOLOGIA

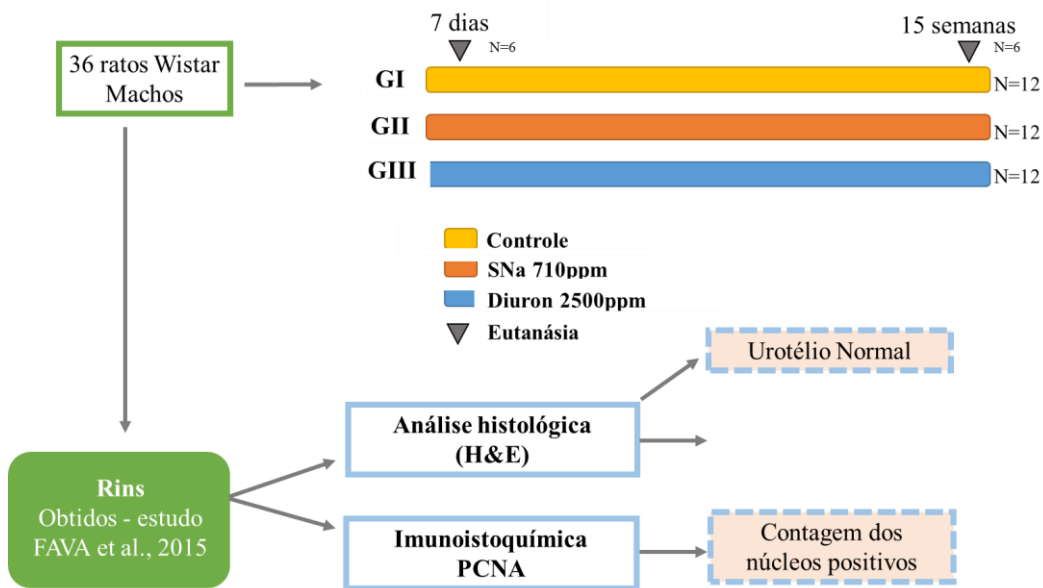
3.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

As substâncias químicas usadas foram a sacarina sódica (SNa) (CAS no. 82385-42-0; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA, $\geq 98\%$ purity) e o diuron (CAS nº 30-54-1; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA 97% purity) e. Essas substâncias foram misturadas à ração comercial em pó (Nuvilab CR1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil) em concentrações finais de 710ppm para a SNa e 2500ppm para o diuron e, que foram escolhidas conforme a literatura (COHEN et al., 1995; USEPA, 1997, respectivamente).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, sob Protocolo 928/2012. O delineamento experimental está apresentado no resumo gráfico abaixo (Figura 1).

Figura 1: Delineamento experimental



No estudo original de FAVA et al. (2015), após aclimação de duas semanas, os ratos foram distribuídos randomicamente em três grupos de 28 animais cada: Controle (ração basal), SNa 710ppm e diuron 2500ppm. Para este estudo foram recuperados aleatoriamente os rins de 36 ratos Wistar machos utilizados desse estudo anterior sendo 18 animais para cada momento (7 dias ou 15 semanas) e seis animais para cada grupo experimental. Esses animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, Campinas, SP. No biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, os animais foram mantidos sob condições ambientais da sala de experimentação na temperatura ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($50 \pm 20\%$), quatro ciclos de exaustão de ar diário e período de 12/12 horas claro/escuro. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

3.3 RETIRADA E PROCESSAMENTO DOS RINS

Após sete (7) dias ou 15 semanas de exposição os animais foram anestesiados com Ketamina (80mL, 90 mg/Kg) e xilazina (2%, 10 mL para 13mg/Kg), administradas intraperitonealmente. A eutanásia foi realizada pela secção da veia cava inferior, após abertura mediana da parede abdominal anterior. Os rins foram removidos e fixados em formalina tamponada à 10% por 48 horas, lavados com água corrente por 24h, colocados em álcool 70% e processados de modo que os cortes histológicos interessassem a pelve renal.

3.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram processadas para análise histológica confeccionando-se lâminas com cortes de 5 μ que foram corados pelo método Hematoxilina e Eosina (H&E). Os critérios histológicos para eventuais lesões hiperplásicas da pelve renal foram os mesmos estabelecidos para avaliação do urotélio da mucosa vesical, ou seja, aumento da espessura do epitélio acima de quatro camadas celulares (COHEN, 1983; ITO & FUKUSHIMA, 1989).

3.4 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Cortes histológicos de 5 μ de espessura de rins esquerdo e direito de 06 (seis) animais por grupo colocados em lâminas silanizadas foram desparafinizados e submetidos à reação imunoistoquímica para análise da expressão da proteína nuclear de proliferação celular (PCNA), utilizando-se a técnica de imunocomplexo de avidina-biotina peroxidase (HSU et al., 1981). Para ambos os anticorpos primário (PC-10, Dako Corporation, USA) e secundário (Vector Laboratories, CA, USA) foi utilizada a diluição de 1:200. Como controle positivo de marcação foi utilizado corte histológico de intestino de rato, que é rico em células proliferantes. Com auxílio de microscópio óptico convencional (Olympus BX 40) na magnificação de 400x foram contados todos os núcleos de células uroteliais do epitélio que reveste a pelve renal, nos animais dos diferentes grupos experimentais, independentemente de estarem ou não marcados para o antígeno de interesse (PCNA). O índice de marcação celular (IM) foi calculado dividindo o número de núcleos PCNA positivos pelo número total de núcleos contados, multiplicando o resultado por 100.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os índices de marcação (IM) dos diferentes grupos (controle, SNa e diuron) foram comparados entre si utilizando-se o teste de amplitudes múltiplas de Duncan. Para comparação das incidências de hiperplasia simples observada na coloração por hematoxilina e eosina (H&E) utilizou-se o teste exato Fisher. Para ambos os parâmetros as diferenças foram assumidas como significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA PELVE RENAL

O único tipo de alteração histológica encontrado no epitélio da pelve renal foi hiperplasia simples (HS), que consistiu de espessamento homogêneo e focal do urotélio, sem formação de papilas. As incidências de HS urotelial nos animais expostos à SNa ou ao diuron foram de 5/6 e 3/6 após 7 dias e de 2/6 e 5/6 após 15 semanas estavam aumentadas, porém, sem diferir significativamente dos respectivos controles (2/6 e 1/6). Nenhuma outra alteração histológica foi observada nos rins dos animais analisados (Tabela 1, Figuras 2,3).

4.2 ÍNDICE DE MARCAÇÃO (IM)

Embora não diferissem de modo significativo entre os grupos, os IMs dos animais expostos à SNa ou ao diuron estavam aumentados em relação aos respectivos controles, independentemente do tempo de exposição, 7 dias ou 15 semanas (Tabela 1, Figuras 2 e 3).

Tabela 1. Incidências de hiperplasia simples (HS) e índices de marcação (IM) pelo anticorpo anti-PCNA na pelve renal de ratos Wistar expostos a SNa 710ppm e por 7 dias ou 15 semanas.

Grupo	Incidência de HS na Pelve renal ^{a,b}	Índice de Marcação ^c
7 dias		
Controle	2/6	14,63 ± 2,21
SNa 710ppm	5/6	19,52 ± 2,27
Diuron 2500ppm	3/6	22,82 ± 3,77
15 semanas		
Controle	1/6	16,98 ± 2,57
SNa 710ppm	2/6	23,63 ± 2,70
Diuron 2500ppm	5/6	20,98 ± 3,46

HS: Hiperplasia Simples; MO: Microscopia óptica; DP: Erro padrão; SNa: sacarina sódica.^a Valores expressos por animal; ^b Teste exato de Fisher, ^c Teste de amplitude múltiplas de Duncan

Figura 2: Pelve renal de ratos Wistar dos grupos: controle, SNa e diuron após 07 dias de exposição. (A, B, C, coloração de H&E; a, b, c, marcação pelo anticorpo anti-PCNA) (aumento 100x).

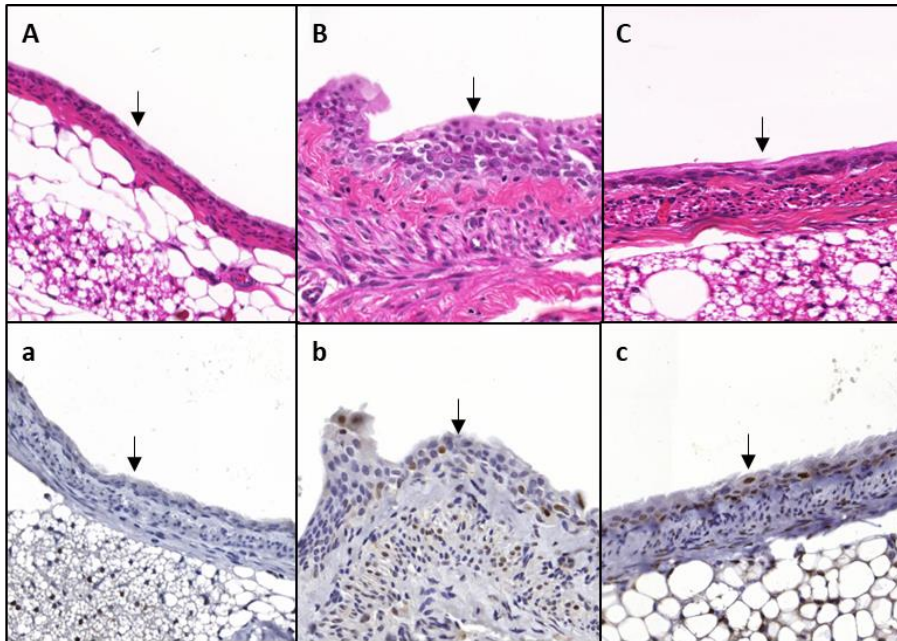
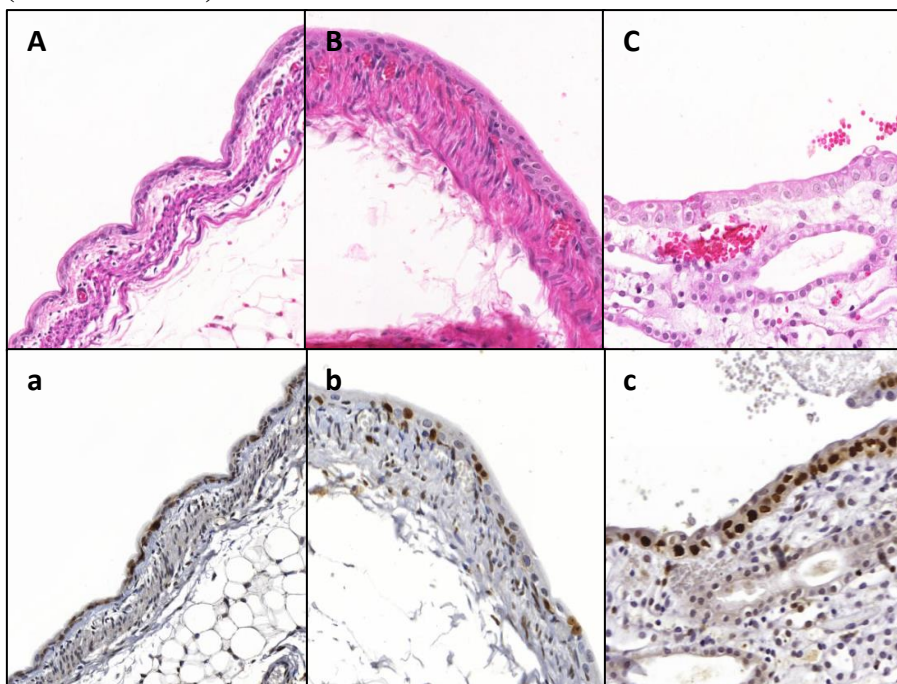


Figura 3: Pelve renal de ratos Wistar dos grupos: controle, SNa e diuron após 15 semanas de exposição. (A, B, C, coloração de H&E; a, b, c, marcação pelo anticorpo anti-PCNA) (aumento 100x)



5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o diuron e a sacarina sódica induzem alterações proliferativas no epitélio de revestimento (urotélío) da pelve renal. Para cancerígenos não-genotóxicos, isto é, aqueles que não interagem diretamente com o DNA, o aumento da proliferação celular é considerado um evento-chave importante e necessário para o desenvolvimento tumoral, ainda que necessite de outros eventos complementares, e.g., alterações moleculares, para que a evolução para neoplasias uroteliais seja atingida (COHEN et al., 2016).

A estrutura e função do trato urinário inferior de roedores são muito semelhantes ao de humanos no que tange a pelve renal, ureteres, bexiga e uretra, porém, com menor número de camadas de células epiteliais (COHEN, 1983; OYASU, 1995; SOUZA et al., 2018). Desde que o trato urinário é revestido com o mesmo epitélio, teoricamente essas regiões poderiam desenvolver lesões proliferativas semelhantes. Entretanto, lesões na uretra ou ureter são raras nos ratos. Isto pode ser explicado pela passagem rápida da urina contendo substâncias tóxicas por estes compartimentos, em comparação com o contato mais demorado destas na bexiga onde a urina fica armazenada (COHEN, 1983; OYASU, 1995).

A indução de tumores uroteliais pela exposição ao diuron ou a SNa ocorre através do aumento da proliferação celular, por diferentes MOAs. Após ingestão, o diuron é absorvido pelo sistema gastrointestinal e extensivamente metabolizado e excretado na urina (IYER, 2002; DA ROCHA et al., 2014). Assim, o modo de ação (MOA) pelo qual o diuron induz lesões no urotélío do rato a altas doses envolve ativação para metabólitos tóxicos, principalmente N-(3,4-dichlorofenil) ureia (DCPU) e em menor quantidade 4,5-dichloro-2-hidroxifenil ureia (2-OH-DCPU) que concentrados na urina induzem citotoxicidade, degeneração celular, esfoliação e necrose seguidas de hiperplasia regenerativa e eventualmente formação de tumores (DA ROCHA et al., 2010; 2012; 2013; 2014). Diferentemente do diuron, o desencadeamento do processo de toxicidade urotelial após exposição a altas concentrações de SNa é dependente de alterações do pH e da composição da urina que possibilitam a formação de precipitados sólidos, principalmente pela ligação de altos níveis de proteínas com íons sódio e fosfato de cálcio, que em contato com as células uroteliais induzem microabrasão da mucosa, necrose, esfoliação, proliferação celular regenerativa e ocasionalmente desenvolvimento de tumores (COHEN et al., 1998; 2000).

Em estudos prévios, ratos expostos pela ração ao diuron 2500ppm por períodos variados de até 20 semanas apresentaram aumento no índice de proliferação do urotélio vesical, indicado pela quantificação de núcleos marcados imunistoquímicamente para o PCNA (NASCIMENTO et al., 2006) ou de BrdU (CARDOSO et al., 2013; DA ROCHA et al., 2014; FAVA et al., 2015), e aumento nas incidências de hiperplasia urotelial. De modo similar, e corroborando aquelas observações, o presente estudo mostrou que, embora de modo não significativo, as taxas de proliferação do urotélio da pelve renal estavam numericamente maiores nos animais expostos à SNa e ao diuron quando comparados aos seus respectivos controles, independente do tempo de exposição. Além disso, associadas ao aumento numérico das taxas de proliferação, os animais também apresentaram, à histologia, incidências relativamente aumentadas de hiperplasia urotelial.

Com relação aos animais expostos à SNa, a incidência de hiperplasia no urotélio foi maior no período de sete (7) dias e o aumento do IM mais proeminente no período de 15 semanas. No entanto, nos animais expostos ao diuron esta relação foi ao contrário daqueles expostos a SNa, ou seja, o IM menor na 15ª semana sugerindo que houve a adaptação do urotélio após exposição prolongada ao herbicida.

6 CONCLUSÃO

Conseqüentemente aos diferentes MOAs de carcinogênese urotelial desencadeados por estes agentes químicos i.e., à agressão citotóxica contínua do urotélio pelo herbicida diuron e ou seus metabólitos (DA ROCHA et al., 2014;) ou abrasão pelos sólidos urinários desencadeados pela SNa (COHEN et al., 1998), os índices de marcação observados na pelve renal neste estudo apresentaram-se de forma semelhante aqueles que ocorreram na bexiga de ratos do estudo original de FAVA et al., 2015, o qual utilizou o BrdU como marcador. Os resultados indicam que a pelve renal pode ser utilizada como sítio alternativo ou complementar para estudo de efeitos adversos de substâncias potencialmente citotóxicas para o urotélio.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum interesse financeiro, político ou comercial motivou o desenvolvimento desse trabalho. Durante sua realização, todos os autores estavam associados a instituições acadêmicas, sem quaisquer envolvimento com processos de registro ou de litígio relacionados às substâncias químicas utilizadas.

FINANCIAMENTO

Este trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Auxílio à Pesquisa nº 2012/11210-3), do Centro de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da concessão de uma bolsa de iniciação científica (PIBIC nº 34679).

AGRADECIMENTOS

Lora L. Arnold, do Centro Médico da Universidade de Nebraska, Omaha, NE, EUA, realizou a análise estatística dos índices de marcação celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBY, J. The genotoxicity of sodium saccharin and sodium chloride in relation to their cancer-promoting properties. **Food Chem. Toxicol.**, v.23, n.4-5, p. 507-519, Maio 1985.

CARDOSO, A.P. et al. Dose-response of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in the urothelial mucosa of Wistar rats. **Toxicology.**, v. 312, p. 1-5, Out. 2013.

COHEN, S. M. Pathology of experimental bladder cancer in rodents. In: The Pathology of Bladder Cancer. S.M. **Cohen and G.T. Bryan (eds.)**, CRC Press, Boca Raton, 1983. FL, vol. II, p. 1-40.

COHEN, S.M. et al. Effects of sodium ascorbate, sodium saccharin and ammonium chloride on male rat urinary bladder. **Carcinogenesis.**, v. 16, p. 2743-2750, Nov. 1995.

COHEN S.M., Urinary bladder carcinogenesis. **Toxicol Pathol.**, v. 26, p.121 – 127, Jan. 1998.

COHEN, S.M. et al. Calcium phosphate-containing precipitate and the carcinogenicity of sodium salts in rats. **Carcinogenesis.**, v. 21,n.4, p. 783-792, Apr. 2000.

COHEN, S.M. et al. Investigations of Rodent Urinary Bladder Carcinogens: Collection, Processing, and Evaluation of Urine and Bladders. **Toxicologic Pathology.**, v. 35, p. 337–347, Abr. 2007.

COHEN, S.M.; ARNOLD, L.L.; EMERSON, J.L. Safety of saccharin. **Agro Food Industry Hi-Tech.**, v. 19, p. 24-28, Nov. 2008.

Revinter, v. 11, n. 03, p. 106-118, out. 2018.

COHEN, S.M.; CHOWDHURY A.; ARNOLD L. L. Inorganic arsenic: A non-genotoxic carcinogen. **J Environ Sci.**, v. 49, p. 28-37, Nov. 2016.

CRAWFORD, J.M. The origins of bladder cancer. **Lab Invest.**, v. 88, p. 686-693, Jul. 2008.

DA ROCHA, M.S. et al. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. **Toxicol Sci.**, v. 113, p. 37–44, Jan. 2010.

DA ROCHA, M.S. et al.. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 130, n.2, p. 281–288, Ago.2012.

DA ROCHA, M.S. et al. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. **Toxicology.**, v. 314, p. 238-246, Dez. 2013.

DA ROCHA, M.S. et al. Diuron-induced rat urinary bladder carcinogenesis: mode of action and human relevance evaluations using the International Programme on Chemical Safety framework. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 44, p. 393- 406, Fev. 2014.

FAVA, R.M. et al. Evaluation of early changes induced by diuron in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. **Toxicology.**, v. 333, p.100-106, Jul. 2015.

FIELD, J.A. et al. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. **J. Environ. Qual.**, v.32, p.171–179, Mar. 2003.

FOLEY, J.F. et al. Detection and evaluation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. **The Journal of Histotechnology.**, v. 4, p. 237-241, Jul. 1991.

HSU, S.M.; RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin–biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem Cytochem.**, v. 29, p. 577–580, Abr. 1981.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S. Promotion of urinary bladder carcinogenesis in experimental animals. **Exp Pathol.**, v.36: p.1-15, Set. 1989.

IYER, P. Evidence of the developmental and reproductive toxicity of diuron. Diuron draft. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency. 43p. Sep. 2002

KIRILUK, K.J. et al. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.30: p.199–211, Abr. 2012.

KLAUNING, E.J.; KAMENDULIS, L.M. Chemical carcinogenesis. In. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic of Poisons**. 7ed. McGraw-Hill., 2008, p. 329-379,.

MUSKHELISHVILI, L. et al. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. **J Histochem Cytochem.**, v. 12, p.1681–1688, Dez. 2003.

NASCIMENTO, M.G. et al. Effects of diuron [3-(3, 4dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea] on the urinary bladder mucosa of male Wistar rats. **Toxicology.**, v. 224, p.66-73, Abr. 2006.

OTURAN, N. et al. Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process electro-Fenton. **Chemosphere.**, v. 73, p. 1550–1556, Nov. 2008.

OYASU R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. **Food Chem Toxicol.**, v. 33, p. 747-755, Set. 1995. REUBER, M.D. Carcinogenicity of saccharin. **Environmental Health Perspectives.**, v. 28, p.173-200, Abr. 1978.

SINGH, Z. Toxicological aspects of Saccharin. **Food Biology.**, v. 2, p. 4-7, Jan. 2013.

SOUZA, N.P. et al. Epithelium Lining Rat Renal Papilla: Nomenclature and Association with Chronic Progressive Nephropathy (CPN). **Toxicol Pathol.**, v. 46, p.266-272, Abr. 2018.

TURNER S.D. et al. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue™ rats. **Mutagenesis.**, v. 4, p. 329-332, Jul. 2001.

TYLER, A. Urothelial cancers: ureter, renal pelvis and bladder. **Seminars in Oncology Nursing.**, v.23, p.154-162, Ago. 2012.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Carcinogenicity peer review of diuron: Office of Prevention., 1997. **Pesticides and Toxic Substances.** [Memorandum]. Cincinnati, 22p.

WHYSNER, J.; WILLIAMS, G.M. d-limonene mechanistic data and risk assessment: absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferating, and tumor promotion. **Pharmacol Ther.**, v.71, n. 1-2, p.127-36, Mar.1996.

ⁱ Graduação em Farmácia pela Universidade Sagrado Coração.

ⁱⁱ Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Sagrado Coração; Mestrado em Patologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu; Doutoranda em Patologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu.

ⁱⁱⁱ Graduação em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo; Especialização em Patologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Mestrado e Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

^{iv} Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; Mestrado e Doutorado em Patologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. E-mail para contato: mdeolive@fbm.unesp.br