

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE INSETICIDAS PIRETRÓIDES
EM TECIDO ADIPOSEO DE NEOPLASIA
MALIGNA DE MAMA EM CADELAS**

FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ANDRADE

BOTUCATU – SP
FEVEREIRO, 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE INSETICIDAS PIRETRÓIDES
EM TECIDO ADIPOSEO DE NEOPLASIA
MALIGNA DE MAMA EM CADELAS**

FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ANDRADE

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Veterinária.

Orientadora: Profa. Adj. Noeme Sousa Rocha

**BOTUCATU – SP
FEVEREIRO, 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Andrade, Fábio Henrique Evangelista de.

Detecção de inseticidas piretróides em tecido adiposo de neoplasia maligna de mama em cadelas / Fábio Henrique Evangelista de Andrade. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Assunto CAPES: 50503006

1. Cão - Câncer 2. Mamas - Câncer 3. Oncologia veterinária

CDD 636.7.0896944

Palavras-chave: Cadela; Carcinogênese química; Histopatologia: HPLC; Neoplasia mamária; Piretróide

TESE DE DOUTORADO
FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ANDRADE

Composição da Banca Examinadora

Orientador: Profa. Adj. Noeme Sousa Rocha

Profa. Assist. Dra. Michiko Sakate

Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

Profa. Dra. Márcia Bersane Araújo de Medeiros

Botucatu, 29 de janeiro de 2008.

*A meus Pais,
Por terem iniciado essa longa jornada
de formação do meu ser incompleto*

*A minha orientadora pela
perseverança no processo de
lapidação do meu aprendizado*

*Ao amigo Roberto Manzan
(in memoriam) pela amizade e companheirismo
no início dessa experiência educacional*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu DEUS, por ter me dado os meus pais, e por intermédio deles, eu vir a nascer, para que possa cada vez mais retribuir essa dádiva de vida que me foi presenteada, e com isso poder servir ao próximo.

A Universidade Estadual do Maranhão pela concessão da bolsa juntamente com a CAPES/CNPq e a todos os meus amigos do Curso de Medicina Veterinária, por acreditarem que eu posso contribuir com o meu trabalho junto ao meio acadêmico desta Instituição.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP por me receberem no seu ambiente acadêmico de maneira acolhedora.

Aos amigos e educadores Renée Laufer Amorim, Julio Lopes Sequeira, José Paes de Almeida Nogueira Pinto e Germano Francisco Biondi, que com bondade e confiança participaram da minha jornada com seus ensinamentos valiosos, primordiais para o alicerce da minha vida como docente.

Ao amigo de sempre Luiz Antonio e Angélica Matiazzi, por terem me recebido como pais, junto com todas as suas famílias, tornando os meus dias nesta cidade menos solitários e mais família.

Ao amigo Roque Bonjoão (*in memoriam*) pelos momentos de companhia e amizade, se pudéssemos escolher os avós, você seria um deles. Também a toda a sua família, que me acolheu de forma amável em seu seio fraterno.

Ao amigo Sérgio Vicensotto e sua esposa Nilsa, pelo apoio incontestado de pai, nos momentos em que eu sempre precisei.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Veterinária, sempre amigos Maury Raul e Noel Melo, pelas dicas de como executar uma tarefa de forma correta dentro do meu time da Patologia Veterinária.

Aos amigos de convívio inicial na pós-graduação, Adriana “bebê”, Louisiane, Anne, Gaspar, Sara, Giovana, Luís, Veridiana e Caio serão sempre eternos amigos.

Aos pós-graduandos, Sandra Bassani, Marcela Marcondes, Camila Porto, Leandro Bertoni, Celmira Calderón, Edna Teresa de Lima (Galega), Rafael Torres, Ana Paula Maceno, Pedro Pinczowski, Isabelle Ferreira, Luciano Fonseca, pelos momentos de companheirismo e auxílio no âmbito acadêmico e fora dele com os encontros informais que nos trouxeram tantas alegrias, nunca os esquecerei.

Aos residentes Fábio, Rômulo, Arlete, Giuliana, Didier, Arita, Guilherme, Anita, Ticiane pelo apoio técnico, amizade e companheirismo no cotidiano do Serviço de Patologia desta FMVZ/UNESP.

Aos residentes da Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais pela obtenção das peças cirúrgicas, amostras biológicas utilizadas nesta pesquisa.

A Denise Zuccari Bissacot, por ter me auxiliado de maneira primordial na realização das análises toxicológicas, a você e ao CEATOX o meu muito obrigado.

Aos Docentes que contribuíam no meu aprimoramento com uma pequena porção de sabedoria e conhecimento, foram extremamente importantes.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a conclusão deste trabalho acadêmico.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
Considerações Gerais	5
Embriologia	5
Morfofisiologia	5
Carcinogênese mamária em cadelas	7
Exposição a compostos piretróides como fatores de risco para neoplasias mamárias	10
3. OBJETIVOS	14
3.1. Geral	14
3.2. Específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Seleção dos Animais	16
4.2. Procedimento	16
Coleta do material e exame citopatológico	16
Procedimento Cirúrgico	17
Exame Histopatológico	17
Exame Toxicológico	17
Métodos de Análise	18
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES	34
8. PERSPECTIVAS	36
9. BIBLIOGRAFIA	38
ARTIGO CIENTÍFICO	

RESUMO

ANDRADE, F.H. E. **Detecção de Inseticidas Piretróides em Tecido Adiposo e Expressão Morfológica de Neoplasia Maligna de Mama em Cadela**. Botucatu, 2008. 45p Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC foi adaptada para detectar e identificar inseticidas piretróides no tecido adiposo adjacente ao tumor maligno de mama de 10 cadelas, sem predileção por raça e idade. Após a cirurgia, as massas eram examinadas cuidadosamente para lesões neoplásicas malignas. Cinco gramas de tecido adiposo adjacente ao tumor foram colhidos para demonstração de contaminantes ambientais. Os piretróides identificados foram aletrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina, com nível de contaminação de 40%. A histopatologia demonstrou sete cadelas (70%) como carcinoma complexo, duas (20%) com carcinoma simples e uma (10%) com carcinoma anaplásico. Desses tumores, (80%) apresentaram grau III e (20%) grau I de agressividade. O nível de contaminação foi observado nos tumores mais agressivos. Esta foi à primeira demonstração que se tem conhecimento que o nível de contaminantes ambientais pode ser detectado no tecido adiposo de cadela com tumor maligno de mama, pela HPLC. O presente resultado sugere que contaminantes ambientais possam estar envolvidos com o processo de formação ou associação ao risco de desenvolvimento do câncer de mama de cadela, sendo um indicador para auxiliar na monitoração de piretróides.

Palavra Chaves: Cadela; Carcinogênese química; Histopatologia; HPLC; Neoplasia mamária; Piretróide

ABSTRACT

ANDRADE, F.H. E. **Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.** Botucatu, 2008. 45p Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

High Precision Liquid Chromatography – HPLC was adapted to detect and identify pyrethroid insecticides in adipose tissue adjacent to malignant tumor mammary gland tumor in 10 female dogs, without predilection for breed or age. After surgery, the masses were examined carefully for malignant neoplastic lesions. Five grams of adipose tissue adjacent to the tumor were collected for demonstration of environmental contaminants. The pyrethroids identified were allethrin, cyalothrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin, with a contamination level of 40%. The histopathology demonstrated seven female dogs (70%) as having complex carcinoma, two (20%) with simple carcinoma and one (10%) with anaplastic carcinoma. Of these tumors, (80%) presented aggressiveness degree III and (20%) degree I. The contamination level was observed in more aggressive tumors. This was the first known demonstration in which the level of environmental contaminants could be detected in adipose tissue of female dogs with malignant mammary tumor, by HPLC. The present result suggests that environmental pollutants can be involved with the formation process or association to the risk of development of female dog's breast cancer, being an indicator to aid in monitoring pyrethroids.

Key words: Female dog; Chemical carcinogenesis; Histopathology: HPLC; Mammary neoplasia; Pyrethroid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exame citológico do tumor maligno de mama de cadela: alta celularidade, células volumosas, agrupadas em um padrão alveolar com limites citoplasmáticos indefinidos secretores, núcleos abundantes e nucléolos evidentes, cromatina grosseira. Giemsa..... 21
- Figura 2** - Exame citológico do tumor maligno de mama de cadela: alta celularidade, células epiteliais (seta menor) e mesenquimais (seta maior) volumosas, agrupadas e isoladas com limites citoplasmáticos indefinidos, núcleos abundantes e nucléolos evidentes, cromatina grosseira intercaladas a material amorfo, acidofílico lembrando matriz óssea (cabeça de seta). Giemsa.. 22
- Figura 3** - Cadela Pastor Alemão, 11 anos e 6 meses, 26,60kg, negativo para piretróide. Mama Inguinal Esquerda: Carcinoma complexo/misto, grau I. Produção de matriz cartilaginosa, limite bem definida. HE. 22
- Figura 4** - Cadela Pastor Alemão, 10 anos, 33,80kg, 0,87µg/g de piretróide. Mama Abdominal Cranial Esquerda: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz cartilaginosa, formação tubular com padrão alveolar, células com pleomorfismo e nucléolos evidentes. HE. 23

- Figura 5** - Cadela SRD, 11 anos e 2 meses, 19,00kg, 0,07µg/g de piretróide. Mama Abdominal Caudal Esquerda: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz condróide, formação tubular com padrão alveolar, células com pleomorfismo e nucléolos evidentes e áreas de microcalcificação. HE. 23
- Figura 6** - Cadela SRD, 12 anos, 7,10kg, 0,03µg/g de piretróide. Mama Abdominal Caudal Direita: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz, formação tubular com padrão alveolar, células com pleomorfismo e nucléolos evidentes e áreas de esclerose. HE. 24
- Figura 7** - Cadela SRD, 9 anos, 13,20kg, 0,82µg/g de piretróide. Mama Abdominal Cranial esquerda: Carcinoma Simples, grau III. Padrão lobular com infiltração. HE. 24
- Figura 8** - O estudo indica em porcentagem a incidência da expressão morfológica e a classificação do tumor maligno em mama de cadela associada à análise por HPLC para detecção e identificação de piretróides. 25
- Figura 9** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC: Cromatograma do padrão de inseticida piretróide para detectar e identificar os níveis de contaminação do tecido adiposo adjacente ao tumor de mama de cadela. 25

- Figura 10** - Cromatograma HPLC: Cadela SRD, 9 anos 13,20kg.
Identificação do inseticida piretróide tetrametrina em
amostra de tecido adiposo adjacente ao tumor de
mama (carcinoma simples), indicado pela seta (tempo
de retenção = 7,4 min) 26

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Incidência dos níveis de contaminantes ambientais presentes no tecido adiposo adjacente aos tumores malignos de mama de cadela. 26
- TABELA 2** - Estimativa dos níveis de contaminação por piretróides de futuras amostras. Frequências observadas das amostras de tecido adiposo de tumor maligno de mama de cadela. 27
- TABELA 3** - Estimativa dos níveis de contaminação por piretróides de futuras amostras. Frequências esperadas das amostras de tecido adiposo de tumor maligno de mama de cadela..... 27
- TABELA 4** - Apresentação sumária e esquemática dos resultados de parâmetros analisados ao final do estudo. 27

LISTA DE ABREVIATURAS

EPA = ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY

USA = UNITED STATE OF AMERICA

IARC = INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER

WHO = WORLD HEALTH ORGANIZATION

INCA = INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

HPLC = HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

CCPA = CLÍNICA CIRÚRGICA DE PEQUENOS ANIMAIS

FMVZ = FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNESP = UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CEATOX = CENTRO DE ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA

SRD = SEM RAÇA DEFINIDA

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de mama representam 50% de todas as neoplasias que acometem as cadelas (JOHNSTON *et al.*, 1993; DALECK *et al.*, 1998; OLIVEIRA, *et al.*, 2003), e destes tumores 41 a 53% são de caráter maligno (GILBERTSON *et al.*, 1983; MAC EWEN & WITHROW, 1996; O'KEEFE, 1997; MORRISSON, 1998; SOREMNO, 1998; FONSECA & DALEK, 2000; ZUCCARI, *et al.*, 2004) com incidência de duas a três vezes maiores do que a observada na mulher (BRODEY *et al.*, 1983).

Por apresentar várias características epidemiológicas, clínicas e comportamento biológico semelhantes aos tumores de mama na mulher, a cadela vem se tornando um excelente modelo comparativo para o entendimento dos vários aspectos da carcinogênese para ambas as espécies (MAC EWEN, 1990; PELETEIRO, 1994).

A causa exata das neoplasias mamárias na mulher e na cadela ainda permanece em estudo, mas acredita-se que pode decorrer de uma interação complexa à susceptibilidade de fatores. Tratando-se de um processo dinâmico o tumor de mama pode ser influenciado por fatores do próprio hospedeiro, como linhagem, hereditariedade, raça, idade, obesidade e hormônios ou externos como a contaminação ambiental, potencializando ou reduzindo a resposta individual (SCHNEIDER *et al.*, 1969; HAMILTON *et al.*, 1997; NERURKAR *et al.*, 1989; CASSALI, 2000; O'BRIEN, 2000; BURINI, 2002; HATAKA, 2004).

Os piretróides estão entre os contaminantes ambientais mais freqüentes e o seu uso vem crescendo exponencialmente nos últimos anos

(MATOS *et al.*, 2002; INCA, 2006). Agem no combate e controle de pragas na agricultura, pecuária, insetos vetores que parasitam animais de companhia no ambiente doméstico. A alta frequência no emprego disseminado deste contaminante, principal suporte dos programas de combate de doenças está associado, à sua eficiência no controle de pragas e meia vida relativamente curta (WRIGHT, 1971; WHO, 1976; MARICONI, 1980; GOULART, 2004).

No homem e nos outros animais, os piretróides são facilmente absorvidos pelas vias digestória, respiratória e cutânea. Uma vez absorvidos são distribuídos por diversos tecidos, porém concentram-se principalmente no adiposo.

A IARC inclui os agrotóxicos, principalmente a deltametrina e a cipermetrina no grupo 3 de periculosidade (IARC, 2005; EPA, 2004), isto é, não conclusivo carcinogênicos para o homem e a OMS classifica a deltametrina como inseticida moderadamente perigoso.

Os piretróides parecem não apresentar potencial cancerígeno para o homem, porém os estudos sobre esta ação não são conclusivos. No entanto, estudos recentes indicam que existem evidências suficientes para avaliarmos com maior cuidado a toxicidade desse composto (KLAASSEN, 2001).

Considerando que se trata de um estudo que ainda não é utilizado em Medicina Veterinária o objetivo deste trabalho foi detectar e identificar os níveis de inseticidas piretróides em tecido adiposo adjacente ao tumor maligno de mama de cadela pelo método de HPLC e correlaciona-los com o grau de agressividade da neoplasia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Considerações Gerais

Embriologia

No terço inicial da gestação a mama de cadela surge ao longo de cada lado da superfície ventral do feto como um espessamento ectodérmico em forma de crista que se estende desde o broto do membro anterior até o posterior, ao longo de cada lado da superfície ventral do feto. A partir deste espessamento começa a se estender sólidos cordões epiteliais da epiderme para o interior do tecido subjacente. Os cordões celulares formam gradativamente ramificações dos ductos primários primitivos (DYCE *et al*, 1997; MOORE & PERSAUD, 2004).

A proliferação do mesênquima que envolve o broto se eleva e forma projeções sobre a superfície corpórea. Essas projeções epidérmicas crescem no broto mamário no interior do tecido conjuntivo de mamilo e começa a se canalizar por volta do nascimento.

Para cada mamilo, que na cadela são em número de cinco pares, há um sistema de ductos e orifícios separados, cada um associado à massa glandular (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Morfofisiologia

A glândula mamária é uma estrutura que apresenta respostas variáveis aos hormônios esteróides. Sua interação hormonal é complexa, envolvendo os esteróides sexuais que atuam por via autócrina, parácrina e endócrina. O estradiol possui importante papel no desenvolvimento das células ductais e do estroma. A progesterona, em sinergismo com o estradiol e a prolactina, promove o desenvolvimento e diferenciação acinar. O crescimento dos ductos e do tecido glandular continua após a puberdade, especialmente durante a primeira gestação, formando tumefação que empurra o mamilo para fora da parede corpórea. O processo é controlado por uma interação intrincada de vários

hormônios da hipófise, dos ovários e de outras glândulas endócrinas (SHIDA *et al*, 2001; MOORE & PERSAUD, 2004).

Cada mama consiste de glândulas alveolares compostas e individualizadas que possuem aberturas separadas em uma elevação superficial cônica denominada de mamilo. Na época do nascimento, já se formou um sistema de ductos rudimentares em cada mama, porém o verdadeiro desenvolvimento é interrompido neste estágio. Essa interrupção é quebrada na puberdade, por influências hormonais, onde os mamilos tornam-se proeminentes, o sistema de ductos epiteliais desenvolve-se além do estágio rudimentar, mas esta alteração não é tão surpreendente quanto ao aumento na quantidade de tecido adiposo. Os alvéolos secretores não se desenvolvem nessa época; eles se formam apenas durante a gravidez. (SILVERMAN, 1996; PARK & JACOBSON, 1996; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; MOORE & PERSAUD, 2004)

O tecido mamário é um tipo altamente modificado e especializado de glândula sudorípara apócrina, compostas de diferentes proporções de tecido adiposo, estroma e epitélio. O epitélio consiste de pequenas estruturas acinares, associadas em lóbulos, contínuas com pequenos e grandes ductos, que se ligam para formar os ductos lactíferos. Cada ducto lactífero é revestido por epitélio cilíndrico cúbico e uma camada externa descontínua de células mioepiteliais, cada ducto é também envolvido por tecido conjuntivo frouxo alimentado por uma rede capilar. Esses ductos terminam nos seios lactíferos que se abrem no mamilo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; MOORE & PERSAUD, 2004; KIERSZENBAUM, 2004).

Ductos coletores contêm músculos lisos que drenam o leite para as cisternas. O ducto lactífero ou canal do teto é desprovido de glândulas e revestido de epitélio pavimentoso estratificado.

Os lobos apóiam-se em delicado estroma de tecido conjuntivo, enquanto os ductos estão envoltos por estroma mais denso, e adipócitos envolvem o tecido das mamas. A quantidade de tecido adiposo varia consideravelmente, dependendo da idade e da constituição corporal do animal. É a variabilidade do tecido adiposo a principal responsável pelas diferenças no

tamanho global da mama. Enquanto a cadela jovem possui mamas densas e fibrosas, já as senis, por outro lado, constituem-se principalmente por tecido adiposo (HILL'S, 1999).

A pele que circunda o mamilo, a aureola, predominantemente é pigmentada e contém glândulas sebáceas que não estão associadas a folículo piloso. Todas as células que constituem a mama são diferenciáveis no que diz respeito a aspectos ultra-estruturais e moleculares, podendo a expressão de moléculas específicas ser utilizadas com um marcador celular.

Na cadela as mamas são em número de 10, dispostas em alinhamento bilateral que se estendem da região torácica a inguinal, por isso denominadas torácicas craniais e caudais, abdominais craniais e caudais e inguinais. Os mamilos indicam a posição das glândulas.

A inervação das mamas torácicas é realizada pelos nervos subcutâneos laterais enquanto as abdominais e inguinais são inervadas pelo feixe superficial ventral dos três primeiros nervos lombares. O suprimento sanguíneo das mamas torácicas é realizado pelos ramos cutâneos das artérias intercostais e, as abdominais e inguinais, pelos ramos das artérias torácicas laterais e epigástricas superficiais. O trajeto das veias segue os mesmos que os das artérias (LUIZ *et al*, 2002).

A drenagem linfática é feita para os linfonodos axilares e para os inguinais. Essa drenagem pode sofrer variação individual, assim como ser influenciada pelo período de lactação.

Carcinogênese mamária em cadelas

A carcinogênese, termo geral utilizado para designar o desenvolvimento de neoplasias, é um fenômeno anormal, ativo e descontrolado que envolve as funções de proliferação, diferenciação e morte celular (WEINSTEIN, 1988 e COTRAN *et al.*, 2000). Este processo, no início localizado e que pode se disseminar pelo organismo é consequência de alterações genéticas

que podem ser induzidas por agentes externos, sejam estes químicos, físicos e/ou biológicos (PITOT & DRAGAN, 1991).

O câncer é a segunda causa de morte no mundo em seres humanos (IARC, 1987; INCA, 2006). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, o número de mortes devido a neoplasias ocupa o segundo lugar, superado apenas por causas externas e mal definidas e doença aterosclerótica cardiovascular e cerebral. Como agravante, a incidência de neoplasias de pulmão e da mama vêm apresentando rápido crescimento (BRASIL MS, 2007; INCA, 2008).

Na medicina veterinária, o elevado número de animais acometidos por neoplasias demonstra necessidade de realização de estudos na área de carcinogênese que abordem as causas, o comportamento biológico, o diagnóstico e fatores modificadores do prognóstico das neoplasias. Além disto, o diagnóstico de doenças neoplásicas em cães tem aumentado consideravelmente aliado a maior longevidade observada nesta espécie. Isto se deve, em parte, ao maior desenvolvimento e disponibilidade de manobras preventivas como vacinações e alimentação balanceada, mas também devido ao acesso a meios diagnósticos mais precisos (DE NARDI *et al.*, 2002).

De todos os tipos de tumores observados nos animais domésticos de pequeno porte, as neoplasias mamárias apresentam as maiores incidências, particularmente em cadelas (MARTINS & FERREIRA, 2003). Em estudo realizado no estado do Paraná, DE NARDI *et al.* (2002) observaram alta incidência de tumores mamários em cadelas, sendo que as neoplasias neste tecido representavam 45,64 % de todos os tumores avaliados entre os anos de 1998 e 2002. Dos 152 casos estudados, 68,4% eram neoplasias malignas e sua maior incidência foi observada em cadelas com idade entre sete e 12 anos. De fato, a ocorrência de tumores de mama em cadelas jovens é rara, observando-se significativo aumento de incidência a partir dos oito anos de idade (MIALOT, 1988).

Com relação às características das neoplasias mamárias, localizações múltiplas podem ser comuns, no entanto 2/3 dos tumores se desenvolvem nas mamas M4 e M5. De modo geral, cerca de 40% dos casos

existe associação de tumores benignos e malignos. A classificação morfológica dos tumores de mama em cadela é muito variável e, de forma geral, existe um consenso para a distinção entre adenomas, carcinomas e tumores mistos benignos e malignos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, esses tumores podem ser classificados em benignos, malignos, não classificados, hiperplasias e displasias mamárias. Entre os carcinomas estão os carcinomas *in situ*, carcinoma complexo, carcinoma simples com subtipos tubulopapilar, sólido e anaplásico e ainda os carcinomas especiais, que incluem o carcinoma de células fusiformes, células escamosas, mucinoso e o rico em lipídios. Existem ainda os sarcomas (osteosarcoma e fibrossarcoma), o carcinosarcoma e os carcinomas e sarcomas em tumores benignos (MEUTEN, 2002).

MIALOT (1988) ressalta que 25% a 50% dos tumores mamários malignos produzem metástases em um ano após a remoção cirúrgica, sendo que a sobrevivência dos animais acometidos pode variar, dependendo do tipo neoplásico, de semanas a dois anos após a detecção das metástases, que se desenvolvem preferencialmente nos pulmões (80%) e nódulos linfáticos (60%).

Quanto à etiologia dessas neoplasias, é destacado o envolvimento hormonal, especialmente quanto à exposição do tecido mamário aos estrógenos. Assim, o risco de desenvolvimento de tumores mamários é de 0,5% em cadelas esterilizadas antes do primeiro cio, enquanto para as esterilizadas após o primeiro e segundo, o risco é de 8% e 26% respectivamente (MIALOT, 1988). Outros autores (PELETEIRO, 1994; PEREZ et al., 1998; SOREMNO, 1998) ressaltam que o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas também está relacionado a fatores nutricionais, uma vez que a obesidade no primeiro ano de vida predispõe as fêmeas a estas neoplasias. A utilização de dietas inadequadas não só resulta em maior depósito de gordura no tecido subcutâneo como também em aumento nas taxas de conversão de hormônios andrógenos em estrógenos (PINOTTI & TEIXEIRA, 2000).

Nas mulheres, os fatores de risco para o desenvolvimento de tumores mamários mais citados são: presença de doença proliferativa mamária, idade avançada, ocorrência de carcinoma em mama contralateral ou endométrio,

exposição a xenoestrógenos, a radiação, maior duração da vida reprodutiva, nuliparidade, obesidade e idade avançada na primeira gestação. Entre os fatores etiológicos estão: os genéticos (já bem definidos na espécie humana), ambientais e, como observado em cadelas, influências hormonais e nutricionais (LESTER & COTRAN, 1999; PINOTTI & TEIXEIRA, 2000; LAMARTINIERE, 2002; BRODY & RUDEL, 2003).

Os fatores hormonais, em ambas as espécies, estão associados ao excesso de estrógeno endógeno; especificamente a desregulação hormonal e situações que implicam em aumento na exposição das células do tecido mamário ao estrógeno (vida reprodutiva longa, nuliparidade, idade avançada da primeira gestação). Do mesmo modo, os fatores nutricionais são os relacionados à obesidade, que por sua vez está associada à liberação de estrógenos pela gordura depositada após a idade adulta; no caso das mulheres, no período pós-menopausa (FONSECA & DALEK, 2000).

Exposição a compostos piretróides como fatores de risco para neoplasias mamárias

Há considerável interesse público e científico acerca do possível papel dos contaminantes ambientais na etiologia das neoplasias de forma geral, especificamente com relação a substâncias químicas sintéticas lançadas no meio ambiente e com as quais os seres vivos têm contato por exposição direta ou indireta. Em mulheres, os fatores ambientais têm sido bastante investigados. Alguns autores ressaltam que os fatores de risco já estabelecidos (como idade avançada, menopausa tardia, idade avançada da primeira gestação, familiares com neoplasias mamárias) explicam por volta de 25 a 50% dos casos ocorridos entre mulheres; sendo que, os casos restantes podem estar, de alguma forma, associados a exposições ambientais a agentes químicos (BAGGA *et al.*, 2000; SNEDEKER, 2002).

Cada substância química tem um padrão único de distribuição, ação e eliminação do organismo, com diferente potencial em contribuir ou não para aumento do risco do câncer de mama. Alguns compostos químicos podem ser

prontamente metabolizados e eliminados, ao passo que outros são cumulativos em tecido adiposo, tornando-se mais concentrados conforme passam pela cadeia alimentar e sendo acumulados por longos períodos. Em mulheres, existe um consenso com relação à investigação da exposição a pesticidas e sua correlação com o desenvolvimento de neoplasias mamárias, pois os pesticidas têm ampla utilização e distribuição ambiental (SNEDEKER, 2002). Algumas das substâncias conhecidas por induzirem neoplasias mamárias em roedores incluem os solventes orgânicos (benzeno, 1,2-dicloroetano), fármacos (reserpina e pesticidas diclorvos) (LAMARTINIERE, 2002; BRODY & RUDEL, 2003).

Com relação aos piretróides, estes são inseticidas sintéticos amplamente utilizados para controle de agentes patogênicos, desde a produção agrícola até a proteção da saúde humana, porém apesar de suas inúmeras vantagens podem causar intoxicações em indivíduos potencialmente expostos às suas diversas apresentações (espirais, *sprays*, vaporizadores) (KLAASSEN, 2001).

O piretróide é um inseticida natural obtido da percolação das flores de algumas plantas pertencentes à família *Asteraceae*, gênero *Chrysanthemum* e espécie *cinerariaefolium*, um dos mais antigos inseticidas conhecidos pelo homem, sendo já utilizado na Mesopotâmia, muitos anos antes da era cristã. (PAIVA & MENEZES, 2003).

O piretróides sintéticos são derivados da síntese de piretrinas que são extraídas dos piretros, extrato óleo-resinoso, obtido a partir da secagem de flores do *Chrysanthemum*. As propriedades inseticidas das piretrinas são provenientes de derivados de ésteres cetoalcóolicos dos ácidos piretróico e crisantêmico. Estes ácidos são fortemente lipofílicos e de rápida penetração em insetos e paralisam o sistema nervoso. Ambos, piretrinas e piretróides sintéticos são vendidos como pesticidas comerciais usados para controle de pragas (insetos) na agricultura, em habitações, comunidades, restaurantes, hospitais, escolas, e como um tratamento tópico de infestações de piolhos em cabeças humanas. Varias formulações destes pesticidas são freqüentemente combinadas

com outros químicos conhecidos como sinergistas para aumentar o potencial e a persistência no ambiente (REIGART & ROBERTS, 1999, KLAASSEN, 2001).

Os inseticidas piretróides são absorvidos pela pele, por inalação e pelo trato gastrointestinal, e com relação a sua ação tóxica, provoca experimentalmente em ratos, efeitos neurológicos provavelmente de origem periférica. Estas intoxicações podem ocorrer com exposição a curto, médio ou longo prazo, crônica ou aguda, de caráter accidental ou intencional, sendo que a velocidade e quantidade da absorção nas diferentes vias são determinadas pelas propriedades físico-químicas do agente tóxico, da formulação empregada e por fatores fisiológicos e anatômicos do organismo atingido. A lipossolubilidade, juntamente com a natureza lipídica das membranas biológicas, constitui o fator mais importante a serem considerado, assim como a presença de solventes em sua composição (LARINI, 2000; SODERLUND *et al.*, 2002).

Muitos piretróides têm sido relacionados com desregulação do sistema endócrino e pode afetar a reprodução e desenvolvimento sexual, interferindo também com o sistema imune e aumentando as chances de causar câncer de mama. Estes são xenoestrógenos que podem aumentar a quantidade de estrógenos no organismo (GAREY & WOLFF, 1998; EJAZ *et al.*, 2004). Quando testados, os piretróides demonstram significativamente estrogenicidade e aumento dos níveis de estrógenos nas células de câncer de mama (GO *et al.*, 1999, LAMARTINIERE, 2002; KASAT *et al.*, 2002), Por aumentar a divisão celular, potencializando a formação de tumores malignos em mamas.

Com relação aos animais domésticos de pequeno porte, não são observados dados na literatura a respeito da investigação de resíduos de pesticidas piretróides em tecidos corporais. Dessa forma, animais de companhia como o cão que se encontram expostos ao mesmo ambiente que seres humanos, favoreceram através deste estudo a investigação de contaminantes ambientais, e a possibilidade de estarem envolvidos com o processo de formação ou associação ao risco de desenvolvimento do câncer de mama.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho teve como objetivo detectar inseticidas piretróides em tecido adiposo adjacente ao tumor maligno de mama de cadela.

3.2. Específicos

Detectar inseticidas piretróides em amostra de tecido adiposo adjacente ao tumor maligno de mama de cadela pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Correlacionar os níveis dos piretróides detectados pela HPLC e o grau de agressividade dos tumores malignos de mama expresso na morfologia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos Animais

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMVZ– UNESP Campus de Botucatu e teve também a obtenção do consentimento livre e esclarecido pelos proprietários ou responsáveis pelos animais.

Os critérios de inclusão foram: cadelas, sem predileção por raça e idade com tumor de mama, independente de localização da cadeia mamária, sem história pregressa de cirurgia de mama. Os animais faziam parte do contingente atendido no setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais (CCPA), do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP) de Botucatu.

4.2. Procedimento

Após exame clínico do animal e registro dos dados, foi realizado o exame citológico para diagnóstico e triagem das amostras.

Coleta do material e exame citopatológico

Foi realizado após a antissepsia do local, utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis 13 x 4,5 mm (insulina) para punção de nódulos mamários menores que 1,0 cm e 30 x 7 e 30 x 8 para nódulos cujo diâmetro ultrapassasse 1,0 cm; seringas hipodérmicas descartáveis de 10 mL e citoaspirador de Valeri para acoplamento das seringas. As lâminas obtidas do material citoaspirado foram fixadas em metanol 100% e coradas em Giemsa. Posteriormente, foram analisadas ao microscópio de luz (ZEISS – Modelo AXIO Imager A1) nas objetivas de: 10x para verificação do controle de qualidade da amostra; 20x para avaliação da expressão morfológica das células; e por fim 40x

para conclusão do diagnóstico, levando em consideração às características de malignidade, segundo McKEE (1997) e RASKIN & MEYER (2003). Posteriormente, esses diagnósticos foram confirmados pelo exame histopatológico.

Procedimento Cirúrgico

Os animais com diagnóstico citopatológico de câncer de mama foram submetidos a nodulectomias, mastectomias parciais ou radicais. As peças cirúrgicas foram encaminhadas ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu para análise anatomopatológica.

Exame Histopatológico

De cada peça cirúrgica antes de ser pesada, mensurada e analisada, retiraram-se 5g de tecido adiposo adjacente ao tumor. Posteriormente, um fragmento de 1 cm² de cada tumor foi fixado em formalina tamponada a 10%. A seguir procederam-se os cortes histológicos de 0,4 µm em micrótomo rotativo (Laica – Modelo RM 2155), e os cortes foram submetidos ao método de coloração rotineiro de HE. A leitura do material foi realizada em microscópio de luz (ZEISS – Modelo AXIO Imager A1), seguindo os critérios de classificação adotados pela Organização Mundial de Saúde (HAMPE & MISDORPE, 1971).

Exame Toxicológico

Os 5g de tecido adiposo adjacente ao tumor permaneceram em refrigeração na temperatura de -4° C até o processamento para a análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC, segundo o método de BISSACOT & VASSILIEFF (1997), modificado. A determinação quantitativa das concentrações de resíduos de piretróides, ocorreu pela extração do princípio ativo contido nas amostras de tecido adiposo com o solvente orgânico acetonitrila, separação em n-hexano e purificação em coluna de sílica-gel com n-hexano e éter

dietílico. Para análise, utilizou-se o cromatógrafo, modelo CG 480C do Centro de Assistência Toxicológica, CEATOX do Instituto de Biociências/UNESP – campus de Botucatu. Para a leitura dos níveis de piretróides foi utilizado um detector ultravioleta modelo CG 435B com comprimento de onda de 266nm, integrando os picos padrão e amostra com 2.0 de atenuação, 300 de inclinação numa velocidade de 10mm/min.

Métodos de Análise Estatística

De acordo com a natureza das variáveis, optou-se pelo emprego de médias, desvio padrão, frequências expressas em representações esquemáticas dos dados.

A análise estatística realizada baseou-se no teste do *Qui-quadrado* (χ^2) para a verificação da existência de associação ou interdependência das variáveis, adotando-se um $\alpha= 5\%$. Para a averiguação da estimativa dos níveis de contaminação por piretróides em futuras detecções que possam estar presentes no tecido adiposo de animais, utilizou-se cálculo estatístico de probabilidade para obtenção das frequências.

5. RESULTADOS

Ao longo da fase de estudo, 10 animais foram incluídos nas análises assim distribuídos: cinco (50%) eram Sem Raça Definida (SRD), três (30%) Pastor Alemão, um (10%) Cocker Spaniel e um (10%) Teckel. A idade dos animais variou de 7 a 14 anos, sendo: quatro (40%) entre sete e nove anos, três (30%) de 10 a 11 anos e três (30%) de 12 a 14 anos.

A distribuição anatômica do tumor na cadeia mamária foi: a localização abdominal oito (60%), foi o local de maior incidência, seguida de torácica duas (20%); e inguinal duas (20%).

No exame citopatológico observou-se alta celularidade, o que permitiu identificar a expressão morfológica das células e selecionar as neoplasias (Figuras 10 e 11). Posteriormente, os diagnósticos foram confirmados pelo exame histopatológico no seguinte padrão: sete (70%) apresentaram-se como carcinoma complexo e suas variantes, túbulo-papilífero (1), papilífero (1), túbulo-alveolar (1), sólido (4) e 20% carcinoma simples com as variantes: lobular infiltrativo (1) e ductal infiltrativo (1); 10% anaplásico. Além disso, foi possível graduar em graus I e III, sendo grau I dois tumores (20%) e grau III oito tumores (80%), Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Em cada 5g de tecido adiposo adjacente aos tumores das 10 cadelas foram detectados piretróides em quatro animais distribuídos da seguinte forma: uma (10%) cadela SRD, com nível de $0,82\mu\text{g/g}$ de tetrametrina (Figura 9 e 10); uma (10%) Pastor Alemão com $0,55\mu\text{g/g}$ de deltametrina e $0,32\mu\text{g/g}$ de cialotrina; uma cadela SRD com $0,02\mu\text{g/g}$ de deltametrina e $0,05\mu\text{g/g}$ de aletrina e uma cadela SRD com níveis de $0,03\mu\text{g/g}$ de cipermetrina (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os animais positivos para detecção e identificação, bem como os níveis dos piretróides. Por outro lado, quando se comparou o nível de contaminação com a expressão morfológica das neoplasias, se observou que os contaminantes detectados estavam presentes somente nos tumores mais agressivos.

O peso corpóreo dos animais com níveis de positividade para contaminação ambiental foi distribuído da seguinte forma: o peso máximo foi de 33,80kg, seguido por 19,00kg, 13,20 kg, e 7,10kg. Em relação a este parâmetro, é possível observar que o animal com maior peso corpóreo apresentou maior nível de contaminação, 0,87 μ g/g em tecido adiposo, sendo 0,55 μ g/g de deltametrina e 0,32 μ g/g de cialotrina, do que os animais com níveis de contaminação inferior.

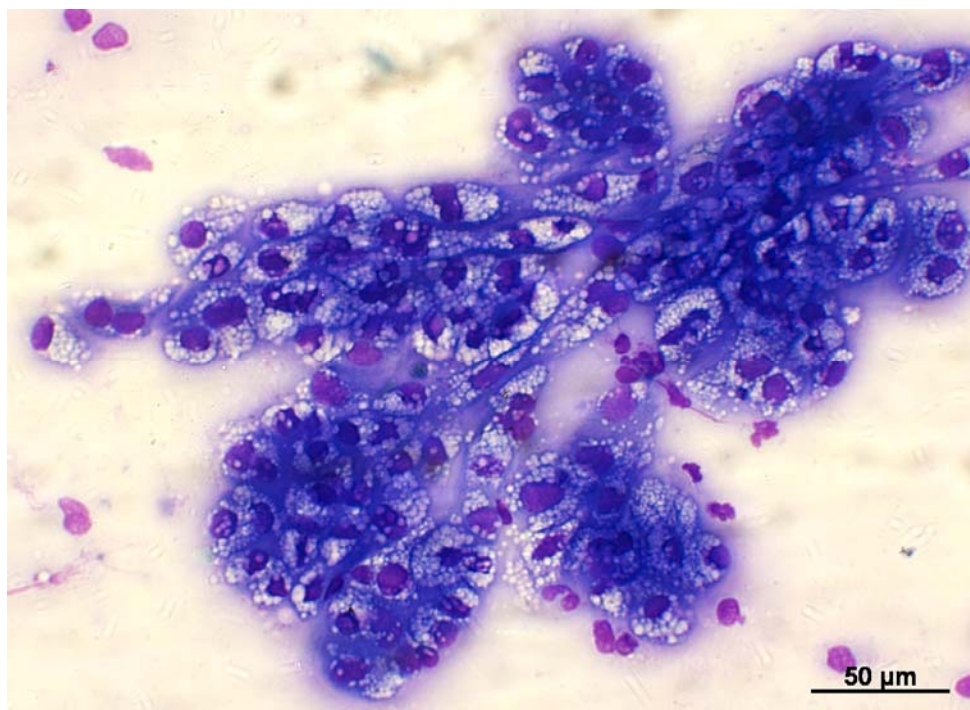


Figura 1 - Exame citológico do tumor maligno de mama de cadela: alta celularidade, células volumosas, agrupadas em um padrão alveolar com limites citoplasmáticos indefinidos secretores, núcleos abundantes e nucléolos evidentes, cromatina grosseira. Giemsa, 400x.

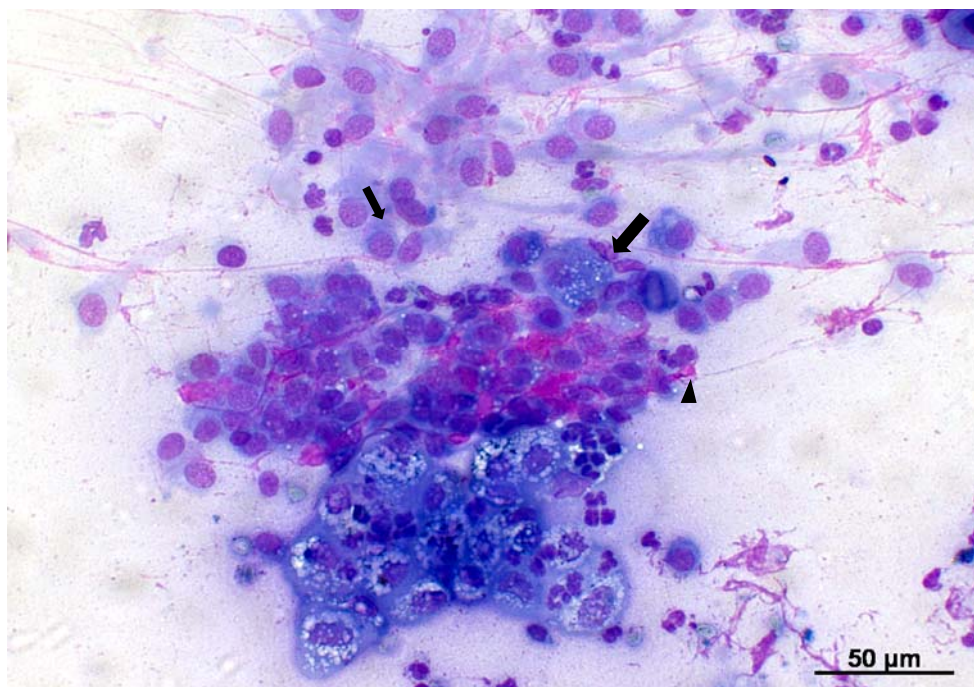


Figura 2 - Exame citológico do tumor maligno de mama de cadela: alta celularidade, células epiteliais (seta menor) e mesenquimais (seta maior) volumosas, agrupadas e isoladas com limites citoplasmáticos indefinidos, núcleos abundantes e nucléolos evidentes, cromatina grosseira intercalada a material amorfo, acidofílico lembrando matriz óssea (cabeça de seta). Giemsa, 400x.

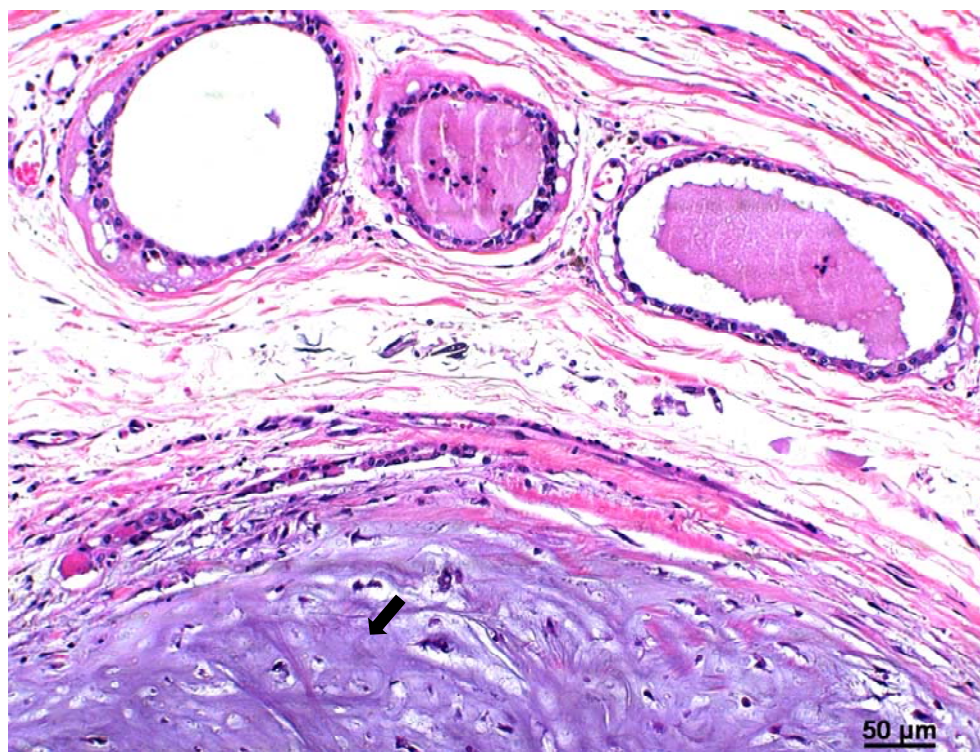


Figura 3 - Cadela Pastor Alemão, 11 anos e 6 meses, 26,60kg, negativo para piretróide. Mama Inguinal Esquerda: Carcinoma complexo/misto, grau I. Produção de matriz cartilaginosa (seta), limite bem definido. HE, 200x.

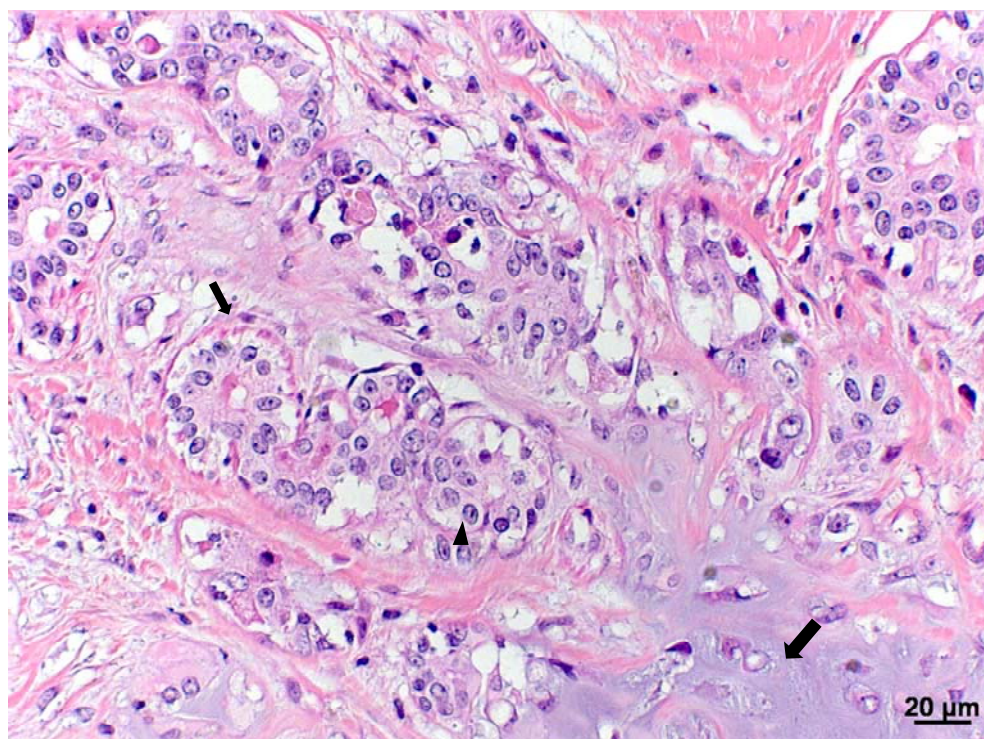


Figura 4 - Cadeira Pastor Alemão, 10 anos, 33,80kg, 0,87 μ g/g de piretróide. Mama Abdominal Cranial Esquerda: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz cartilaginosa(seta larga), formação tubular com padrão alveolar(seta estreita), células com pleomorfismo e nucléolos evidentes(cabeça de seta). HE, 200x.

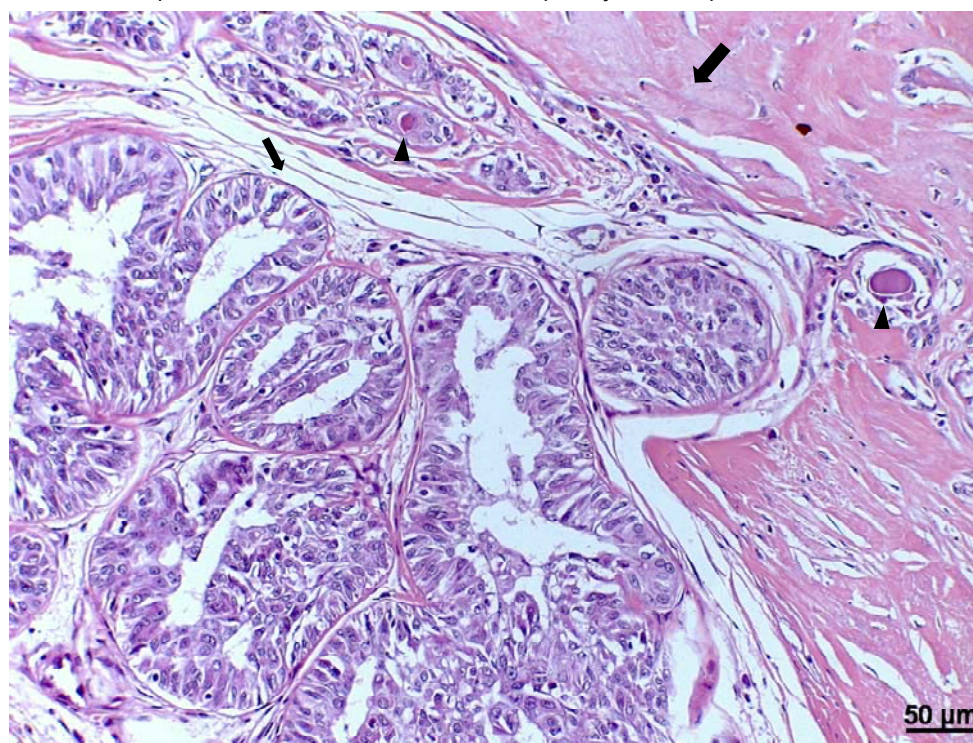


Figura 5 - Cadeira SRD, 11 anos e 2 meses, 19,00kg, 0,07 μ g/g de piretróide. Mama Abdominal Caudal Esquerda: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz condróide(seta larga), formação tubular com padrão alveolar(seta estreita), células com pleomorfismo e nucléolos evidentes e áreas de microcalcificação(cabeça de seta). HE, 200x.

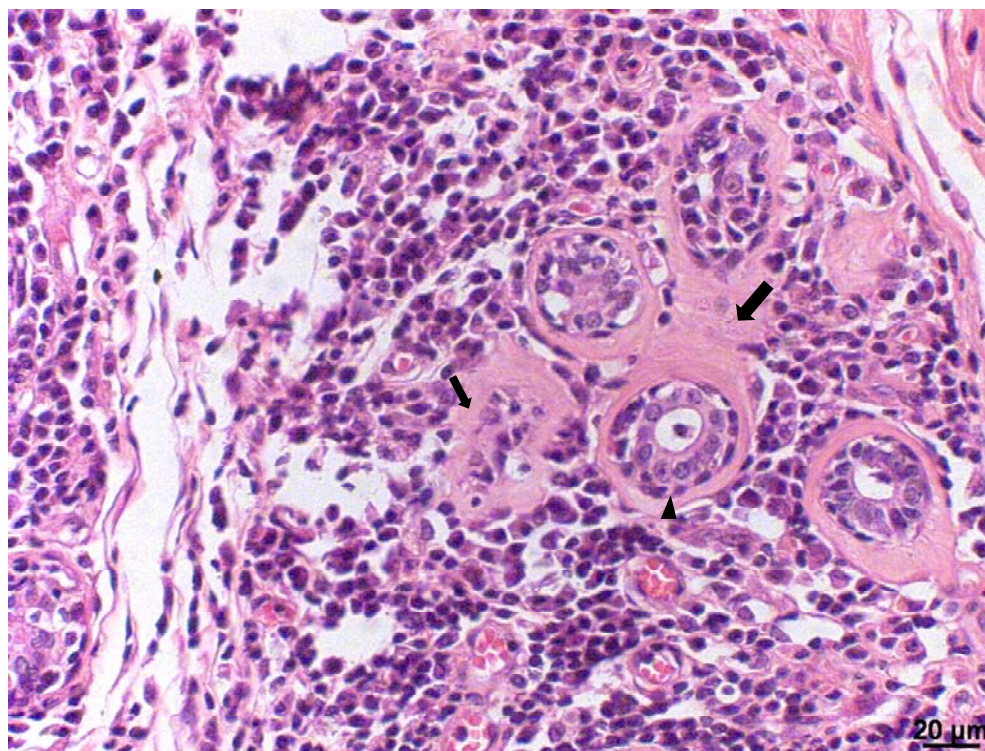


Figura 6 - Cadela SRD, 12 anos, 7,10kg, 0,03μg/g de piretróide. Mama Abdominal Caudal Direita: Carcinoma complexo, grau III. Produção de matriz(seta larga), formação tubular com padrão alveolar(cabeça de seta), células com pleomorfismo e nucléolos evidentes e áreas de esclerose(seta estreita). HE, 200x.

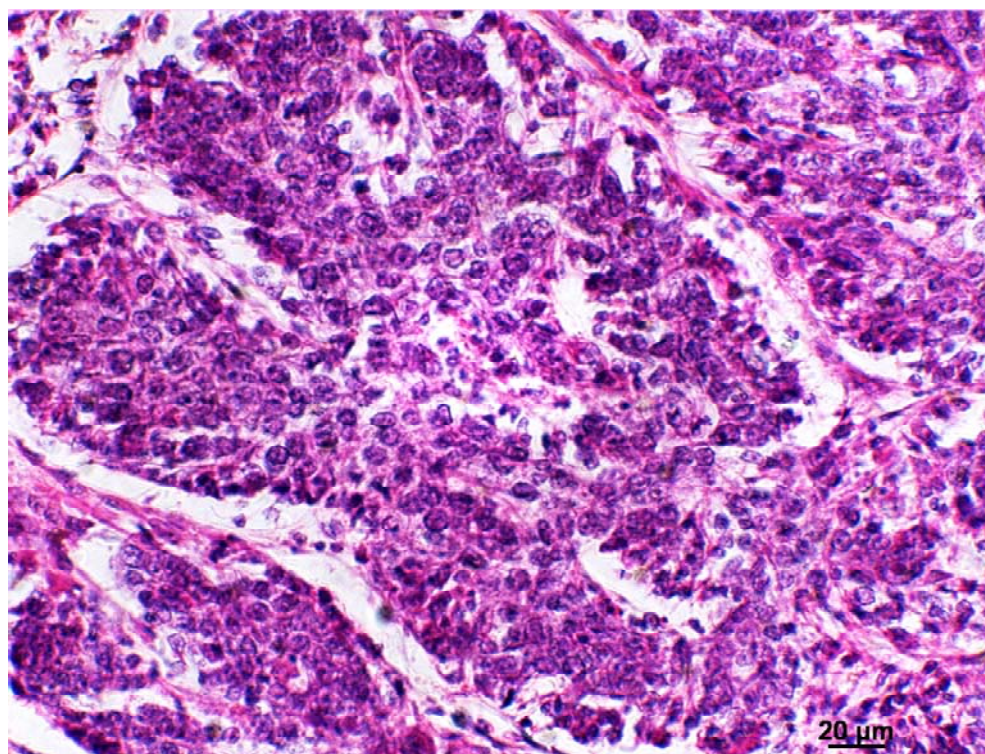


Figura 7 - Cadela SRD, 9 anos, 13,20kg, 0,82μg/g de piretróide. Mama Abdominal Cranial esquerda: Carcinoma Simples, grau III. Padrão lobular com infiltração. HE, 200x.

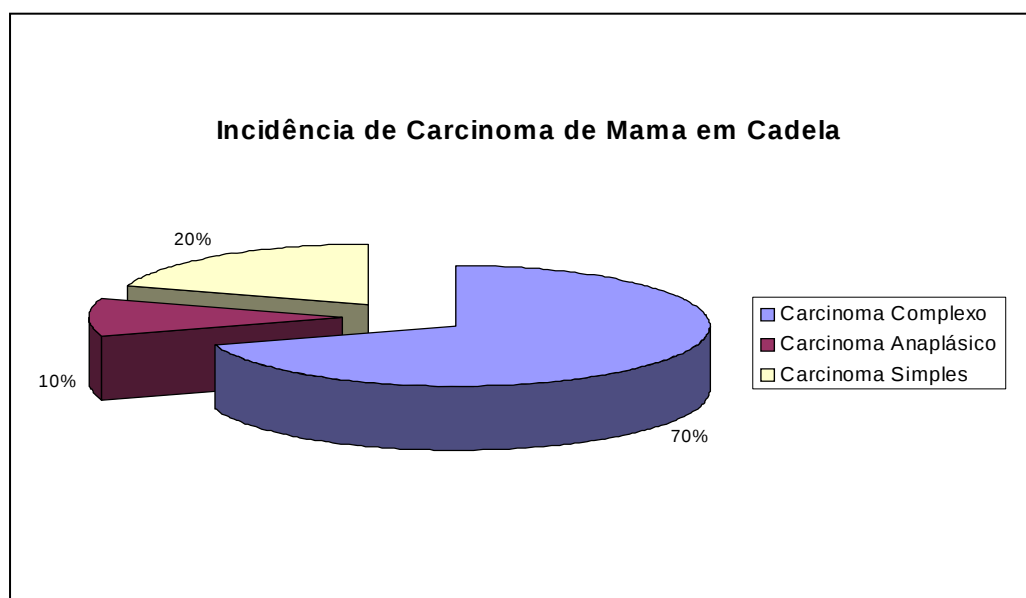


Figura 8 - O estudo indica em porcentagem a incidência da expressão morfológica e a classificação do tumor maligno em mama de cadela associada à análise por HPLC para detecção e identificação de piretróides.

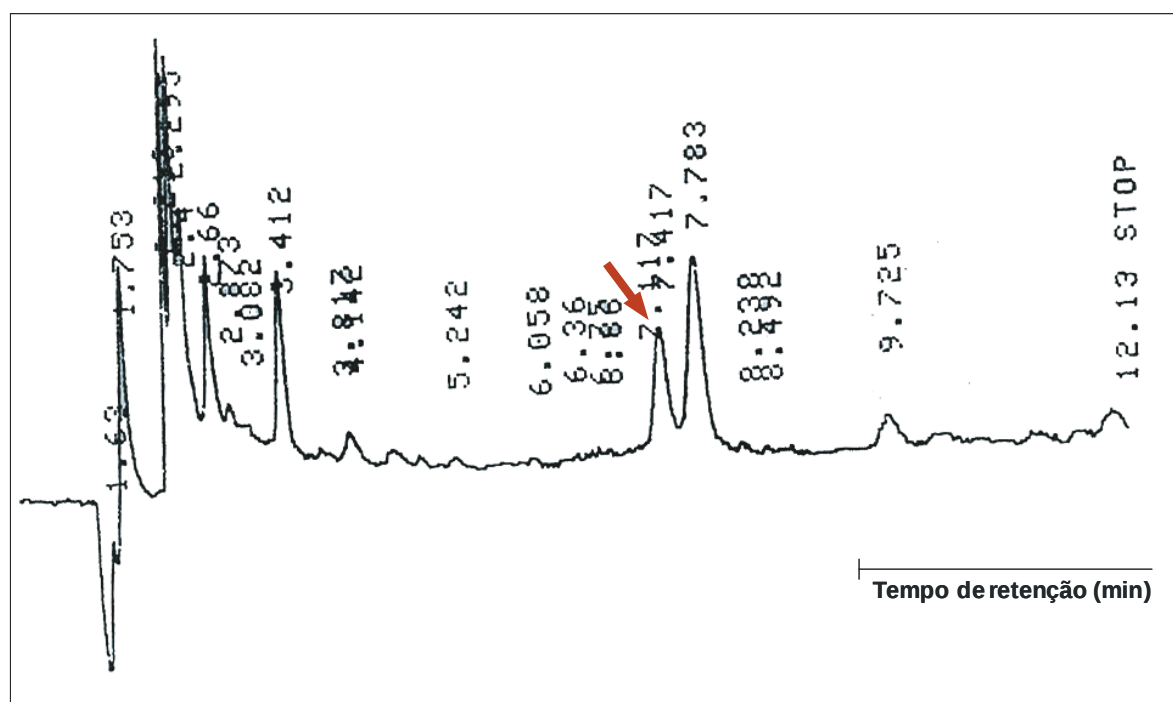


Figura 9 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC: Cromatograma do padrão de inseticida piretróide para detectar e identificar os níveis de contaminação do tecido adiposo adjacente ao tumor de mama de cadela. A seta vermelha indica o pico de detecção.

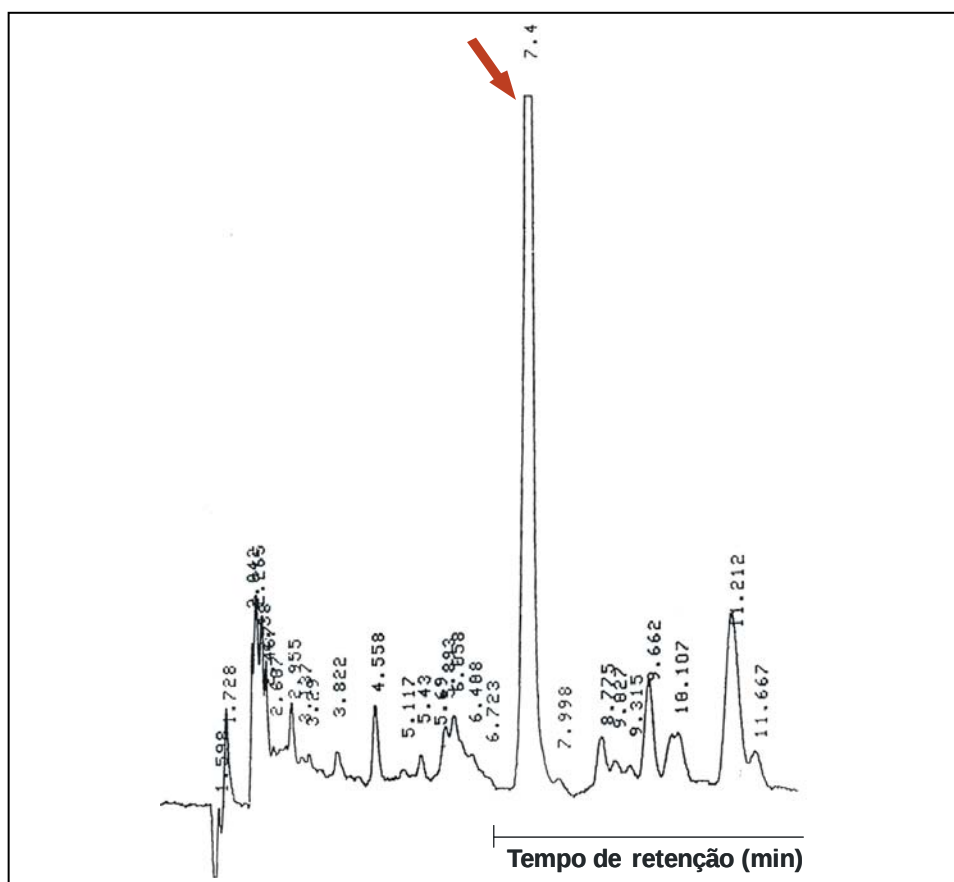


Figura 10 - Cromatograma HPLC: Cadela SRD, 9 anos 13,20kg. Identificação do inseticida piretróide tetrametrina em amostra de tecido adiposo adjacente ao tumor de mama (carcinoma simples), indicado pela seta (tempo de retenção = 7,4 min).

TABELA 1. Incidência dos níveis de contaminantes ambientais presentes no tecido adiposo adjacente ao tumores malignos de mama de cadela.

Tecido Adiposo (em 5g)	PIRETRÓIDE				
	Deltametrina	Aletrina	Cialotrina	Tetrametrina	Cipermetrina
1	0.00	0.00	0.00	0.82	0.00
2	0.55	0.00	0.32	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Σ	0.57	0.05	0.32	0.82	0.03
χ	0.057	0.005	0.032	0.082	0.003
Desv. Pad.	0.173336538	0.01581	0.1011929	0.259306768	0.009486833

Não foram observadas associações ou interdependência entre as variáveis, utilizando-se um nível de significância de 5% de rejeição.

TABELA 2. Estimativa dos níveis de contaminação por piretróides de futuras amostras. Freqüências observadas das amostras de tecido adiposo de tumor maligno de mama de cadela.

Tecido Adiposo (em 5g)											
Piretróide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ
Deltametrina	0.00	0.55	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57
Aletrina	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
Cialotrina	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32
Tetrametrina	0.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.82
Cipermetrina	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03
Σ	0.82	0.87	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	1.47

TABELA 3. Estimativa dos níveis de contaminação por piretróides de futuras amostras. Freqüências esperadas das amostras de tecido adiposo de tumor maligno de mama de cadela.

Tecido Adiposo (em 5g)											
Piretróide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ
Deltametrina	0.3180	0.2133	0.00	0.0271	0.00	0.00	0.00	0.0116	0.00	0.00	0.57
Aletrina	0.0279	0.0187	0.00	0.0024	0.00	0.00	0.00	0.0010	0.00	0.00	0.05
Cialotrina	0.0000	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.00	0.00	0.0000	0.00	0.00	0.00
Tetrametrina	0.4574	0.3068	0.00	0.0001	0.00	0.00	0.00	0.0167	0.00	0.00	0.7743
Cipermetrina	0.0167	0.0112	0.00	0.0014	0.00	0.00	0.00	0.0006	0.00	0.00	0.03

Tabela 4. Apresentação sumária e esquemática dos resultados de parâmetros analisados ao final do estudo.

N	Raças	Idade (ano) $\bar{x} \pm dp$	Peso (kg) $\bar{x} \pm dp$	Neoplasia Maligna (%)	Piretróides ($\mu g/g$)
5	SRD	11,04 $\pm$ 2,12	15,40 $\pm$ 8,34	100	1,55
3	Pastor Alemão	9,53 $\pm$ 2,34	29,47 $\pm$ 4,40	100	0,87
1	Cocker Spaniel	9,0	12,20	100	0,00
1	Teckel	12,0	5,20	100	0,00

6. DISCUSSÃO

A tabela 4 representa sumária e esquematicamente, os resultados dos parâmetros analisados ao final desta pesquisa. Para discussão serão levados em consideração os dados submetidos à estatística, assim como o fenômeno biológico. Para superar as inconsistências verificadas nos resultados deste trabalho, foi desenvolvida uma análise estatística sobre o que aconteceria se as cadelas que não apresentaram contaminantes ambientais, permanecendo nos locais aonde as que exibiram piretróides qual seria o grau de contaminação daqueles animais, visto que, as 10 cadelas analisadas nesta pesquisa não compartilhavam o mesmo ambiente, eram animais de zona rural e urbana. O uso destes piretróides abrange tanto no controle de pragas na agropecuária, como no meio urbano (KLAASSEN, 2001; NAJERA & ZAIM, 2001).

Tanto em estudos epidemiológicos como em ensaios com roedores tem sido demonstrada a influência dos contaminantes ambientais no desenvolvimento de neoplasia, inclusive na de mama (AMORIM *et al.* 2002; INCA, 2006; EPA, 2006). Pesquisadores como GAREY & WOLFF, 1998 salienta que os piretróides podem induzir a quebra da homeostasia de hormônios como os estrógenos e indiretamente influenciar na proliferação celular ou na apoptose, aumentando ou diminuindo-as nas células epiteliais da mama, e desencadeando o processo neoplásico.

A investigação das neoplasias mamárias em cadelas é de extrema importância na medicina veterinária, não só devido à elevada incidência desses tumores, mas devido às semelhanças entre a etiologia e o comportamento biológico dessa enfermidade com o tumor de mama na mulher (SCHNEIDER *et al.*, 1969; HAMILTON *et al.*, 1977; NERURKAR *et al.*, 1989; CASSALI, 2000; O'BRIEN, 2000; BURINI, 2002; HATAKA, 2004).

O presente estudo foi delineado com o objetivo de verificar o possível efeito dos piretróides na carcinogênese mamária de cadela. Como protocolo foi utilizado 10 cadelas sem distinção por raça e idade, que tivessem o diagnóstico de tumor maligno de mama. A detecção e a identificação, bem como os níveis dos diferentes piretróides no tecido adiposo adjacente ao tumor utilizada neste

trabalho foi uma adaptação dos métodos já utilizados por BISSACOT & VASSILIEFF (1997) que para a leitura de níveis de piretróides utilizou um detector ultravioleta com comprimento de onda de 266nm. Essa adaptação foi necessária, porque até o momento, não existe na literatura especializada no assunto utilizando a técnica de HPLC em tecido adiposo de cadelas com tumor de mama maligno. Trata-se de um trabalho pioneiro.

A utilização de duas técnicas de diagnóstico, exame citopatológico e o exame histopatológico nesse trabalho, selecionaram os tumores de mama e evidenciou a expressão morfológica dos critérios celulares de malignidade. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por HAMPE & MISDORPE (1971); McKEE (1997) e RASKIN & MEYER (2003). Em vista disso, informações importantes ao clínico ou cirurgião possibilitam esses profissionais adotarem uma melhor estratégia terapêutica para cada caso. Como se tratava de tumor de mama a excisão cirúrgica foi à conduta escolhida o que permitiu a coleta de tecido adiposo adjacente aos tumores para a detecção e identificação dos níveis de contaminação ambiental.

Com relação à raça, apesar da maioria dos animais serem SRD (cinco), não se pode considerar predisposição racial, visto que outras raças também exibiram neoplasia. Esta observação está de acordo com outros autores que atualmente vêm aceitando a idéia de que a predisposição de raças portadoras de câncer de mama relaciona-se mais àquelas populares em determinada região do que a uma possível predisposição racial (CASSALI, 2000; BURINI, 2002; HATAKA, 2004). Alguns autores citam a ocorrência mais freqüente em animais de grande porte e, parece não existir relação entre raça e neoplasia. No que diz respeito à idade de maior incidência em que a cadela poderá desenvolver tumor maligno de mama, os autores especializados no assunto são unânimes em considerar que os animais com idade a partir de sete anos são os mais susceptíveis (BURINI, 2002; QUEIROGA & LOPES, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; HATAKA, 2004;). A faixa etária dos animais utilizados nesta pesquisa variou de 7 a 14 anos, estando de acordo com os resultados encontrados por estes autores.

Atualmente, no que diz respeito à distribuição anatômica das neoplasias mamárias na cadela os pesquisadores têm demonstrado grande interesse, indicam que a maior incidência desses cânceres está localizada nas mamas abdominais e inguinais, sem, contudo explicarem a tal predileção (MOULTON, 1990; MAC EWEN & WIYHROW, 1996; FONSECA, 1999; BURINI, 2002; QUEIROGA & LOPES, 2002; FERREIRA & CASSALI, 2003; HATAKA, 2004). Neste trabalho, a distribuição anatômica do tumor na cadeia mamária das cadelas não foi diferente das encontradas pelos já citados autores.

Segundo o tipo mais freqüente de neoplasias malignas desenvolvidas na mama de cadela é o carcinoma simples, seguido pelo carcinoma complexo e por fim o anaplásico, independente da localização anatômica na cadeia mamária. De maneira diferente foram os resultados encontrados neste trabalho, pois o tumor de maior incidência foi o do tipo complexo com suas subclassificações, seguido pelo simples também com suas subclasses e por o anaplásico. No entanto, estudos desenvolvidos nas mesmas condições por nosso grupo de pesquisa, também encontrou resultados semelhantes (BURINI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; HATAKA, 2004).

Os piretróides são inseticidas sintéticos utilizados no ambiente agrícola e urbano para controlar insetos vetores, visando o bem estar da saúde do homem e de outros animais (GO *et al.*, 1999; LARINI, 2000). Apesar das vantagens, em 2005, a IARC inclui os pesticidas piretróides, principalmente a deltametrina e a cipermetrina no grupo III, isto é, não conclusivo para o potencial carcinogênico, tanto em estudo epidemiológico como em modelo experimental e a OMS classifica a deltametrina como inseticida moderadamente perigoso, sendo sua dose diária aceitável (ADI) de 0,010 mg/kg).

Os resultados obtidos nessa pesquisa quanto à presença de pesticidas piretróides no tecido adiposo das cadelas com câncer de mama foram de 40%. Entre eles, detectaram-se a tetrametrina, deltametrina, cialotrina, aletrina e cipermetrina. Destes cinco tipos de piretróides detectados, dois estão inclusos na lista de periculosidade devido a toxicidade aguda, tanto da IARC quanto da EPA. Apesar desses órgãos reguladores sobre o uso de piretróides não

concluírem a respeito do nível de exposição a um possível efeito carcinogênico. Na presente pesquisa, é de extrema importância o fato desses contaminantes terem sido detectados e identificados nos tumores classificados como os de maior grau de agressividade, visto que GO *et al.*, (1999) afirmou que os piretróides quando analisados demonstram significativa estrogenicidade em células de câncer mamário. Tumores estes capazes de sobreviver e de se multiplicar indefinidamente, invadir tecidos vizinhos e promover metástases.

Embora o número reduzido de amostra, parece que esses pesticidas interferem no comportamento biológico dessas neoplasias. Para dar consistência a este número reduzido de animais, optou-se por um método estatístico de frequências, para estimativa futura do nível de contaminação dos indivíduos aos piretróides encontrados nesta pesquisa (Tabelas 2 e 3) (ANDRADE, 2008).

Na mulher, existem investigações epidemiológicas com relação ao papel das medidas antropométricas, inclusive peso ou índice de massa corporal, ganho de peso, localização topográfica do tecido adiposo relacionado com o risco de desenvolvimento de neoplasia de mama. (MATHÉ, 2000). De forma semelhante, em cadelas já foi demonstrado que quando magras exibem menor incidência de desenvolverem tumor de mama quando comparadas às cadelas obesas, desta forma fatores nutricionais podem estar envolvidos no desenvolvimento de tumores (PINOTTI & TEIXEIRA, 2000; JERICÓ & SCHEFFER, 2002; STREIFF *et al.*, 2002). No presente trabalho, os resultados estão de acordo com os encontrado pelos autores já citados, visto que, o animal de maior peso corporal (33,8kg) apresentou câncer de mama do mais alto grau de agressividade (Grau III). Além disso, nesse animal foi observado mais um agravante que foram a detecção e identificação de diferentes piretróides, deltametrina (0,55µg/g) e cialotrina (0,32µg/g), sendo a deltametrina não conclusivo com relação ao papel no processo de carcinogênese química (IARC, 2005). Esse resultado vem corroborar a associação de outros fatores no processo da carcinogênese mamária na cadela.

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o trabalho pode-se concluir que:

Considerando que a metodologia da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) adaptada para detectar, identificar e dosar os níveis de contaminação ambiental no tecido adiposo adjacente de tumores malignos de mama de cadela mostrou-se apropriada na utilização para determinar o grau de contaminação ambiental nas cadelas que possam desenvolver tumor de mama.

Considerando que o maior grau de agressividade dos carcinomas era nos animais que exibiram os níveis mais altos de contaminação ambiental e que estes dados tiveram o suporte de métodos estatísticos para os resultados atuais, bem como para uma estimativa futura pode-se estabelecer a associação entre a presença de piretróides e o comportamento biológico do tumor.

Considerando que a grande proporção de neoplasia é atribuída a fatores ambientais, entre eles as substâncias químicas, esse trabalho demonstrou que o cão amigo inseparável do homem, por compartilhar o mesmo ambiente pode servir como um modelo comparativo para auxiliar na identificação e no controle do uso em altas doses destes piretróides, substâncias desreguladoras do sistema endócrino, o que seria possível à prevenção da maioria das neoplasias que possam estar associadas à exposição a tais compostos, além de favorecer um entendimento melhor quanto à forma de tratar os cânceres.

8. PERSPECTIVAS

Os presentes resultados sugerem as seguintes linhas para desenvolvimento posterior:

- Aumentar o número de casos para determinar o possível papel dos contaminantes ambientais no potencial carcinogênico das neoplasias mamárias de cadelas.
- Realizar estudos utilizando modelos experimentais em que o *end-point* seja o desenvolvimento de tumores a fim de se confirmar às evidências deste trabalho de que os piretróides potenciam a ação de outros fatores na progressão da carcinogênese mamária.
- Averiguar possíveis lesões do DNA de células epiteliais mamárias de animais que apresentem níveis de contaminação por piretróides.

9. BIBLIOGRAFIA*

AMORIM, L. da FONTE; ROSSINI A.; MENDONCA, G. LOTSCH P.; de ALMEIDA SIMAO T.; de MOURA GALLO C. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. **Cancer Lett.**, v. 181, p. 179-186, 2002.

BAGGA, D.; ANDERS, K. H.; WANG, H. J.; ROBERTS, E.; GLASPY, J. A. Organochlorine pesticide content of breast adipose tissue from women with breast cancer and control subjects. **J. Natl. Câncer. Inst.**, v.92, p. 750-753, 2000.

BISSACOT, D. Z.; VASSILIEFF, I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in milk and blood of lactating dairy cows. **Jour. Anal. Toxic.** v. 21, p. 397-402, 1997.

BRODEY, R.S., GOLDSCHMIDT, M.H., ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Jour. Amer. Ani. Hosp. Assoc.**,v. 19, 61-69, 1983.

BRODY, J. G. & RUDEL, R. A. Environmental Pollutants and Breast Cancer. **Envir. Heal. Perspective.** v. 111, n. 8, p. 1007-1019, 2003.

BURINI, C. H. P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer de mamário de cadelas sem raça definida.** 2002. 162p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu.

CASSALI, G. D. **Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela:** aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. 2000. 80p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COWELL, R. L.; TYLLER, R. D. Cytology of cutaneous lesions. **Vet. Clin. North American. Small Anim. Pract.** v. 19, p. 769-794, 1989.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 60:** informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database.** Philadelphia, 1996. 468p.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DALECK C.R.; FRANCESCHINI P.H.; ALESSI A.C.; SANTANA A.E.; MARTINS M.I.M. 1998. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. 28: 95-100.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1997. p.289-291.

EJAZ, S.; AKRAM, W. LIM, C. W.; LEE, J. J.; HUSSAIN, I. Endocrine disrupting pesticides: a leading cause of câncer among rural people in Pakistan. **Exp. Oncol.** v. 26, n. 2, p. 98-105, 2004.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. Health Effect Division. Office of Pesticide Programs. **Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential**. Informative, p.49. 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. 2004. Pyrethrins: Report of the Cancer Assessment Review Committee. Third Evaluation. OPP-2005-0043-0010.<http://docket.epa.gov/edkpub/do/EDKStaffItemDetailView;jsessionid=E940D9EFD89989002984FA680928D8E2?objectId=090007d48075c538> Acesso em: 23 jan. 2008.

EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1993. p.531-558.

FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Levantamento dos tumores mamários em cadelas no hospital veterinário da EV/ UFMG. In: XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária – Botucatu/SP, 2003. **Anais...**, p. 258.

FONSECA, C. S. **Avaliação dos níveis séricos de 17-B Estradiol e Progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias**. 1999. 87 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciênc. Rur.**, v. 30, n. 4, p. 731-735, 2000.

GAREY, J.; WOLFF, M. Estrogenic and antiprogesterogenic activities of pyrethroid insecticides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 251, p. 855-859, 1998.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.2, p.1493.

GILBERTSON SR, KURZMAN ID, ZACHRAU RE, HURVITZ AI, BLACK MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphological characteristics assessed in 232 dogs. **Vet. Pathology**, v. 20, p. 127-142, 1983.

GO, V; GAREY, J.; WOLFF, M. S.; POGO, B. G. T. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, p. 173-177, 1999.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ALVES, I. C. In: Reunião Anual da SBQ, 27., 2004, CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUÍMICA, 26., 2004, Salvador. **Anais...**, Salvador, 2004.

HAMILTON, J. M.; ELSE, R. W.; FORSHAW, P. Oestrogen receptors in canine mammary tumours. **Vet. Rec.**, v. 101, p. 258-260, 1997.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bull. Wor. Heal. Org.**, v. 50, p. 111-133, 1974.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia**: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. 2004. 90 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HILL'S. Prevenção da obesidade. In: _____. **Os alimentos mais saudáveis para cães e gatos**. São Paulo, 1999.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER – IARC. Genetic and related effects: an updating of selected IARC monographs from volumes 1 to 42. **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Suppl.**, v. 6, p. 1-729, 1987.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER – IARC. **Overall evaluations of carcinogenicity to humans**. Lyon: IARC, 1987. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>>. Acesso: 22 ago. 2005.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa para 2005 da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2008/estimativas.html>>. Acesso em: 25 jan. 2008.

JERICÓ, M. M.; SCHEFFER, K. C. Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. **Clin. Vet.**, n. 37, p. 25-29, 2002.

JOHNSTON, S. D. Reproductive systems oncology. *In*: SCATTER, D. **Text book of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders Company, 1993. v. 2, p.2177-2200.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 540.

KASAT, K.; GO, V.; POGO, B. G. T.; Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on *WNT10B* proto-oncogene expression. **Envir. International**. v. 28, p. 429-432, 2002.

KLAASSEN C. D.; 6. ed. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed. New York: McGraw-Hill, p. 784-787, 2001.

KIERSZENBAUM A. L. **Histologia e Biologia Celular. Uma Introdução à Patologia**. Ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 654p, 2004.

LAMARTINIERE, C. A. Timing of Exposure and Mammary Cancer Risk. **Jour. Of Mamm. Gl. Bio. And Neoplasia**. v. 7, n. 1, p. 67-76, 2002.

LARINI, Lourival. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole, 230 p, 2000.

LESTER, S. C.; COTRAN, R. S. A mama. In: COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000, cap 25, p979-1002.

LUIZ, C. R.; MIGLINO, M. A.; SANTOS, T. C. Segmentos anátomo-cirúrgicos arteriais da glândula mamária em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus,1758). **Arch. Vet. Sci.** v. 7, n.1, p. 27-36, 2002.

MAcEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastasis Review** 9 125–136, 1990.

MAcEWEN, E. G.; WITHROW, J. S. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 356-372.

MARTINS, D. C.; FERREIRA, A. M. R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Act. Sci. Vet.** v. 31, p.189 – 191, 2003.

MATHÉ, G. Obesity not only holds cardiovascular diseases, it also hold tumors. **Biom. Pharmacoth.**, v. 54, n. 2, 2000 , p. 67-68.

MATOS, G.B.; SANTANA, O. A. M, NOBRE, L. C. C. Intoxicação por agrotóxico. In: Secretaria de Saúde do Estado. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. **Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador**. Salvador: CESAT/ SESAB, 2002. p. 249-280.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate as pragas**. vol 1, 4ª edição, Livraria Nobel, São Paulo, 1980.

McKEE, G. T. **Citopatologia**. São Paulo: Ed. Arts Médicas, 361 p.

MIALOT, J. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. Porto Alegre: **A hora veterinária**. 160p, 1988.

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Iowa State Press. 788 p. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE [Homepage on the Internet]. Brasília: 2007 [cited 2006 Nov 6]. Sistema de Informações sobre Mortalidade. Available from: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>>. Acessado em: 16 mai. 2007.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology – AFIP**. v.7, p.1-59, 1999.

MOORE K. L. & PERSAUD T.V.N. **Embriologia Clínica**. Ed. 7, Editora Elsevier: São Paulo, 632p, 2004.

MORRISON, W. B. Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: _____. **Cancer in dogs and cats**. Baltimore: Williams & Wilkins, cap.50, p. 763-778. 1998.

MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Tumors in domestic animals**. 3ed., Los Angeles: University of California Press, 1990. cap. 12, p.518-552.

NAJERA J. A.; ZAIM M. Malaria vector control: insecticides for indoor residual spraying. Geneva: **World Health Organization**; 2001.

NERURKAR V. R.; CHITALE A. R; JALNAPURKAR B. V.; NAIK S. N.; LALITHA, V. S. Comparative pathology off canine mammary tumors. **J. Comp. Pathology**, v 101, p 388-397, 1989.

O'BRIEN, D. J. Spatial and temporal comparison of selected cancers in dogs and humans, Michigan, USA, 1964-1994. **Prev. Vet. Med.**, v. 47, p. 187-204, 2000.

O'KEEFE, D. A. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. SÃO Paulo: Manole. 1997, v. 2, p. 2344-2351.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Act. Sci. Vet.** v. 31, p. 105- 110, 2003.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas: Comité de expertos en Insecticidas. 22º Informe, WHO Serie n.º 585, Ginebra: **WHO**; 1976.

PAIVA, K. B. S; De MENEZES, M. L. Avaliação do emprego dos adsorventes: carvão ativo, chromosorb w e membrana c18 na preparação de amostras de ar para a determinação de *d*-aletrina em ambientes fechados. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v.28, n.1, p.97-103, 2003.

PARK, C. S.; JACOBSON, N. L. Glândula mamária e lactação. In: _____. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 37, 1996. cap. 37, p.645-59.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Rev. Port. de Ciên. Vet.**, Lisboa, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.

PEREZ, A. D.; RUTTEMAN, G. R.; PENA, L.; BEYNEN, A. C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Jour. of Vet. Inter. Med.**, v. 12, n. 3, p. 132-139, 1998.

PINOTTI, J. A.; TEIXEIRA, L. C. Câncer de mama: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: _____. **Tratado de ginecologia**. 3. ed. V. 3. São Paulo: Roca, 2000. v. 3, cap. 180, p. 2019-2222.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v 5: 2280-86, 1991.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Ver. Port. de Ciên. Vet.**. V.97, p. 119-127, 2002.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Atlas de Citologia de Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: Roca. 2003, p. 233-243.

REIGART, J.; ROBERTS, R. **Recognition and management of pesticide poisonings**. 5 ed. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency EPA, p. 87-88. Disponível em: <www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare>. Acessado em: 18 abr. 2007.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **J. of the Nat. Can. Inst.**, v.43, p. 1249-61, 1969.

SHIDA, J. Y.; GEBRIM, L. H.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, C. E.; LIMA, G. R. Estudo morfológico e morfométrico da mama de ratas em estro permanente, tratadas com danazol. **Rev. Brás. de Ginec. e Obst.**, v. 23, n. 1, p.41-45, 2001.

SILVERMAN, J. F. Breast. In: _____. **Comprehensive Cytopathology**, 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. p.703-770.

SNEDEKER S. M. Environmental chemicals and breast cancer risk why is there concern? Cornell University Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors in Ithaca: 2002 p. 1-8.

SNEDEKER S. M. **Pesticides and breast cancer risk**: a review of DDT, DDE, and dieldrin. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, suppl. 2, p. 35-47, 2001.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D. *et al.* 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicol.** v. 171, p. 3–59, 2002.

SOREMNO, K. An update on canine mammary gland tumors. In: ACVIM Forum, 16, **Proceedings**, p. 387-388, 1998.

STREIFF, E. L.; ZWISCHENBERGER, B.; BUTTERWICK, R. F.; WAGNER, E.; IBEN, C; BAUER, J. E. A Comparison of the Nutritional Adequacy of Home-Prepared and Commercial Diets for Dogs. American Society for Nutritional Sciences. **J. Nutr.** v. 132, p. 1698S–1700S, 2002.

WEINSTEIN, I. B. **The Origins of human cancer**: molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. Twenty-seventh G. H. A. Clowes memorial lecture. **Cancer Res.** 48, 4135-4143, 1988.

WRIGHT, J. W. The WHO programme for the evaluation and testing of new insecticides. **Bull. Wld. Hith. Org.**, v. 44 p. 11-22, 1971.

ZUCCARI, D.A.P.C. Contribuição ao estudo imunohistoquímico dos tumores mamários em cadelas. 1999. 121p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Jaboticabal.

Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Coordinating Board of Editors

Daniel R. Doerge, Ph.D., Editor-in-Chief
National Center for Toxicological Research
7719 12th Street
Paron, AR 72122
Tel: (501) 821-1147
Fax: (501) 821-1146
E-mail: aect_editor@earthlink.net

Print Version: ISSN: 0090-4341

Eletronic Version: ISSN: 1432-0703

Eletronic Divulgation: Springer New York

Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.

Authors Address

ANDRADE, F. H. E.¹; FRANCHI, C. A.². S.; BISSACOT, Z. D.³; RAPOSO, A. B.⁴.;
ROCHA, N. S.^{1*}

1. FÁBIO HENRIQUE EVANGELISTA DE ANDARDE

E-mail: hoibaf@hotmail.com

UNESP São Paulo State University, Departament of Clinical Veterinary, Botucatu – SP, 18618-000, Brazil.

2. CARLA DA SILVA FRANCHI

E-mail: carlaadriene@yahoo.com.br

UNESP São Paulo State University, Departament of Pathology, Botucatu – SP, 18618-000, Brazil.

3. DENISE ZUCCARI BISSACOT

E-mail: denisezb@ibb.unesp.br

UNESP São Paulo State University, Institute of Biosciences, Departament of Toxology, Botucatu – SP, 18618-000, Brazil.

4. ANSELMO BAGANHA RAPOSO

E-mail: anselmoraposo@uol.com.br

UEMA Maranhão State University, Departament of Mathematic

1. NOEME SOUSA ROCHA

E-mail: rochanoeme@fmvz.unesp.br

UNESP São Paulo State University, Departament of Clinical Veterinary, Botucatu – SP, 18618-000, Brazil.

* Address correspondence to:

Noeme Sousa Rocha, Ph. D.

UNESP São Paulo State University, Departament of Clinical Veterinary, Botucatu – SP, 18618-000, Brazil.

Telephone/Fax-simile: 55-14-3811 6293

e-mail: rochanoeme@fmvz.unesp.br

Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.**Abstract**

High Precision Liquid Chromatography – HPLC was adapted to detect and identify pyrethroid insecticides in adipose tissue adjacent to malignant tumor mammary gland tumor in 10 female dogs, without predilection for breed or age. After surgery, the masses were examined carefully for malignant neoplastic lesions. Five grams of adipose tissue adjacent to the tumor were collected for demonstration of environmental contaminants. The pyrethroids identified were allethrin, cyalothrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin, with a contamination level of 40%. The histopathology demonstrated seven female dogs (70%) as having complex carcinoma, two (20%) with simple carcinoma and one (10%) with anaplastic carcinoma. Of these tumors, (80%) presented aggressiveness degree III and (20%) degree I. The contamination level was observed in more aggressive tumors. This was the first known demonstration in which the level of environmental contaminants could be detected in adipose tissue of female dogs with malignant mammary tumor, by HPLC. The present result suggests that environmental pollutants can be involved with the formation process or association to the risk of development of female dog's breast cancer, being an indicator to aid in monitoring pyrethroids.

Key words: Female dog; Chemical carcinogenesis; Histopathology; HPLC; Mammary neoplasia; Pyrethroid

Introduction

Currently, mammary tumors represent 50% of all neoplasias that afflict female dogs (Johnston, 1993; Dalek et al., 1998; Oliveira, et al., 2003), and of these tumors 41 to 53% are of malignant character (Gilbertson et al., 1983; MacEwen and Withrow, 1996; O’Keefe, 1997; Morrisson, 1998; Sorenmo, 1998; Fonseca and Dalek, 2000; Zuccari, et al., 2004) with incidence two- to three-fold greater than that observed in women (Brodey et al., 1983). By presenting various epidemiological and clinical characteristics as well as biological behavior similar to mammary tumors in women, the female dog presents an excellent comparative model for understanding various aspects of carcinogenesis in both species (MacEwen, 1990; Peleteiro, 1994). The exact cause of mammary neoplasias in women and in female dogs is still being researched, but it is believed that they may result from a complex interaction of susceptibility factors. Given that it is a dynamic process, the mammary tumor can be influenced by internal host factors such as genetics, age, breed, obesity and hormones or externalities like environmental contamination that can enable or reduce the individual response (Schneider et al., 1969; Hamilton et al., 1997; Nerurkar et al., 1989; Cassali, 2000; O’Brien, 2000; Burini, 2002; Hataka, 2004). The pyrethroids are among environmental contaminants whose use has grown exponentially in recent years (Matos et al., 2002; Inca, 2006). They act to control pests in agricultural, ranching, pets and other domestic animals. The high frequency in the disseminated application of this contaminant is associated with its efficiency in pest control and its relatively short half-life (Wright, 1971; Who, 1976; Mariconi, 1980; Goulart, 2004). In humans and other animals pyrethroids are readily absorbed cutaneously and in the digestive and respiratory tracts. Once absorbed they are distributed to diverse tissues, but are concentrated principally in adipose tissue. IARC includes agrottoxins, principally deltamethrin and cypermethrin in group 3 of risk

level, that is, non-conclusive carcinogenics for humans while the WHO classifies deltamethrin as a moderately dangerous insecticide (Iarc, 2005; Epa, 2004). Pyrethroids do not appear to present cancerigenic potential to man, but studies on this action are inconclusive. Nevertheless, recent studies indicate that sufficient evidence exists to evaluate the toxicity of this compound with greater caution. Considering that this research line is still unutilized in veterinary medicine, the present study aimed to detect and identify levels of pyrethroid insecticides in female dog adipose tissue adjacent to malignant mammary tumor by the HPLC method and correlate these contaminants with the aggressiveness degree of the neoplasia.

Material and Methods

This research protocol was approved by the Research Ethics Committee of FMVZ–UNESP Campus at Botucatu having also obtained the free and clear consent of the dog owners or those otherwise responsible for these animals. The inclusion criteria were: female dogs, without predilection for breed or age, with mammary tumor, independent of mammary chain localization, without prior history of mammary surgery. The animals were among those attended in the Small Animal Clinical Surgery sector (CCPA), of the Veterinary Hospital in the School of Veterinary Medicine and Zootechnics (FMVZ/UNESP) de Botucatu. After clinical examination of the animal and registration of data, cytological exam was accomplished for diagnosis and triage of samples.

Then local anesthetic was applied, utilizing disposable hypodermic needles 13 x 4.5 mm (insulin) for puncture of mammary nodules smaller than 1.0 cm and 30 x 7 and 30 x 8 for nodules whose diameter surpassed 1.0 cm; disposable hypodermic syringes of 10 mL; Valeri cell aspirator was coupled with syringes. The slides obtained of aspirated cell material were fixed in methanol 100%, colored in Giemsa, and subsequently, analyzed under a light microscope (ZEISS – Model AXIO Imager A1) at the following objectives: 10x to verify quality control of the

sample; 20x to evaluate morphological expression of cells; and finally 40x to conclude the diagnosis, taking into account the malignancy characteristics according to McKee, 1997 and Raskin and Meyer, 2003. These diagnoses were later confirmed by histopathological exam.

The animals with cytopathological diagnosis of mammary cancer were submitted to the surgical procedure of nodulectomies or partial or radical mastectomies. Surgical pieces were forwarded to the Veterinary Pathology Service of FMVZ/UNESP, campus at Botucatu for anatomopathological analysis.

Before each surgical piece was weighed, measured and analyzed, 5g of adipose tissue, adjacent to the tumor, was removed. Then a fragment of each tumor was fixed in 10% buffered formalin. Next, histological cuts of 0.4 micrometers were processed in a rotating microtome (Laica – Model RM 2155). The cuts were submitted to the HE routine coloration method. The reading of the material was accomplished in a light microscope (ZEISS – Model AXIO Imager A1), following the classification criteria adopted by the World Health Organization (Hampe and Misdorpe, 1974).

The 5g of adipose tissue adjacent to the tumor remained refrigerated at -4° C temperature until processing for analysis by High Precision Liquid Chromatography – HPLC, following the method of Bissacot and Vassilieff (1997), with modification. Pyrethroid residue concentrations were determined via extraction of the active principle contained in adipose tissue samples with acetonitrile organic solvent, separation in n-hexane and purification in silica gel column with n-hexane and diethyl ether. The chromatograph utilized for analysis, model CG 480C, was from the Center for Toxicological Assistance (Centro de Assistência Toxicológica), CEATOX of the Biosciences Institute/UNESP – campus at Botucatu. The reading of pyrethroid levels was accomplished with ultraviolet detector model CG 435B with 266nm wavelength, integrating standard peaks and sample with attenuation of 2.0 and slope of 300 at a velocity of 10mm/min.

Due to the nature of the variables, the following parameters were chosen: means, standard deviations, tables and graphs.

The statistical analysis employed was based on the chi-square test to verify the existence of an association or interdependence of variables, adopting $\alpha = 5\%$. To investigate the estimates for pyrethroid contamination levels of future detections that may be present in adipose tissue of animals, statistical probability was calculated to obtain the frequencies.

Results

The guidelines employed, such as animal selection and mammary tumor diagnostic techniques, tissue collection procedure, employment of HPLC technique modification for detection and identification of different pyrethroids, and contamination levels obtained, were well elaborated, in other words, without any occurrence that could interfere in the results.

Throughout the study period there were 10 animals distributed as follows: five (50%) were of undefined breed (mongrel), three (30%) German Shepherd, one (10%) Cocker Spaniel and one (10%) Teckel. Animal age varied from 7 to 14 years as follows: four (40%) between seven and nine years, three (30%) from ten to eleven years and three (30%) from twelve to fourteen years.

The anatomical distribution of the mammary chain tumors in female dogs was: eight abdominal (60%), the location of greatest incidence, followed by two thoracic (20%); and two inguinal (20%).

In general, the cytopathological exam showed rich cellularity, and it was possible to identify morphological expression of the cells and select the neoplasias. Subsequently, these diagnoses were confirmed by histopathological exam in the following pattern: seven (70%) presented complex carcinoma and its variants, tubule-papilliferous (1), papilliferous (1), tubule-

alveolar (1), solid (4) and 20% simple carcinoma with variants: lobular infiltrative (1) and ductal infiltrative (1); 10% anaplastic. Furthermore, it was possible to grade each into degree I and III, with two tumors being of degree one (20%) and eight tumors of degree three (80%).

In each 5g of adipose tissue adjacent to tumors of the 10 female dogs, pyrethroids were detected in four animals distributed in the following manner: one (10%) undefined breed female dog, with 0.82µg/g level of tetramethrin; one (10%) German Shepherd with 0.55µg/g of deltamethrin and 0.32µg/g of cyalothrin (Graph 1); one undefined breed female dog with 0.02µg/g of deltamethrin and 0.05µg/g of allethrin and one female dog undefined breed with 0.03µg/g of cypermethrin. There was no significant difference between the animals positive for detection and identification, as well as the levels of pyrethroids. On the other hand, when contamination level is compared with morphological expression of neoplasias, it was observed that the contaminants detected were present only in more aggressive tumors.

The body weight of animals with levels defined as positive for environmental contamination was distributed as follows: the maximum weight was 33.80kg, followed by 19.00kg, 13.20 kg, and 7.10kg. In relation to this parameter, it is possible to observe that the animal with the highest body weight presented the greatest contamination level, 0.87µg/g in adipose tissue, with 0.55µg/g of deltamethrin and 0.32µg/g of cyalothrin.

Discussion

Table 1 represents a summary and schematic of the results of parameters analyzed at the end of the study. For the discussion, data submitted to statistical analysis will be taken into account along with the biological phenomenon. To overcome the inconsistencies verified in the results of the present work, statistical analysis was developed on what would happen if the female dogs that did not present environmental contaminants would stay in locations where other pyrethroid-positive dogs stayed, specifically, what would be the degree of contamination in those

animals, given that the 10 female dogs analyzed in the present study did not share the same environment, being animals of the rural and urban zones. The use of these pyrethroids includes pest control as much in farming and ranching as in the urban setting (Klaassen, 2001; Najera and Zaim, 2001).

Both epidemiological studies and tests on rodents have demonstrated the influence of environmental contaminants on neoplasia development, including in the breast (Amorim et al. 2002; Inca, 2006; Epa, 2006). Researchers including Garey et al., 1998 emphasize that pyrethroids can induce a breakdown in the homeostasis of hormones such as estrogens and indirectly influence cell proliferation or apoptosis, increasing or diminishing them in mammary epithelial cells, thereby unleashing the neoplastic process.

The investigation of mammary neoplasias in female dogs is of extreme importance in veterinary medicine, not only due to elevated incidence, but also on account of similarities between the etiology and biological behavior of this tumor versus the mammary tumor in women (Schneider et al., 1969; Hamilton et al., 1977; Nerurkar et al., 1989; Cassali, 2000; O'brien, 2000; Burini, 2002; Hataka, 2004).

The present study was delineated with the objective of verifying the possible effect of pyrethroids in female dog mammary carcinogenesis. The protocol consisted of utilizing 10 female dogs without distinction to breed or age that had diagnosis of mammary carcinoma. The detection and identification, as well as levels of different pyrethroids in adipose tissue adjacent to the tumor utilized in this work constituted an adaptation of methods already employed by Bissacot and Vassilieff (1997) that, for reading of pyrethroid levels, utilized an ultraviolet detector with 266nm wavelength. This adaptation was necessary because, to date, the specialized literature on the subject has not presented the use of the HPLC technique in adipose tissue of female dogs with malignant mammary tumor, rendering this a pioneer study.

Utilization of the two diagnostic techniques, the cytopathological exam and histopathological exam, in the present work, selected the mammary tumors and evidenced the morphological expression of cellular criteria of malignancy. These results are in agreement with those found by Hampe and Misdorpe, 1974; Mckee, 1997; Raskin and Meyer, 2003. In this context these important findings enable the clinician or surgeon to delineate a better therapeutic strategy for each case. As this was a mammary tumor, surgical excision was the conduct chosen, which permitted the collection of tissue adjacent to the tumors for the detection and identification of environmental contaminant levels.

In the present work, despite the majority of animals being undefined breed (five), breed bias cannot be considered given that neoplasia was also exhibited in other breeds. This observation agrees with those of other authors that are currently accepting the idea that breed variation in carriers of mammary cancer is related more to relative popularity in a given region than to possible breed predilection (Cassali, 2000; Burini, 2002; Hataka, 2004). However, some authors cite the more frequent occurrence in large-sized animals. Therefore, in reality, no relationship appears to exist between breed and neoplasia. On the other hand, with regard to the age of highest incidence in which the female dog could develop malignant mammary tumors, authors specializing in the subject are unanimous in considering that those aged at least seven years are the most susceptible (Burini, 2002; Queiroga and Lopes, 2002; Hataka, 2004; Oliveira, 2003). The age range of animals utilized in the latter study varied from 7 to 14 years, in accord with the results found by these authors.

Currently, the researchers showing great interest in the anatomical distribution of female dog mammary neoplasias indicate that the highest incidence of these cancers is of abdominal and inguinal localization, but without explaining this predilection (Mouton, 1990; MacEwen and Withrow, 1996; Fonseca, 1999; Burini, 2002; Queiroga and Lopes, 2002; Ferreira and Cassali,

2003; Hataka, 2004). In the latter work, the anatomical distribution of the tumor in the mammary chain of female dogs did not differ from the distributions found by the authors already cited.

The most frequent malignant neoplasia types developed in the female dog breast is simple carcinoma, followed by complex carcinoma and finally anaplasia, independent of anatomical localization in the mammary chain, according to Burini, 2002; Oliveira, 2003; Hataka, 2004. Results were found in a different manner in the latter work since the tumor of greatest incidence was of the complex type with its subclassifications, followed by simple also with its subclasses and, finally, anaplastic. Nevertheless, studies developed under the same conditions by our research group also encountered similar results (Burini, 2002; Hataka, 2004).

Pyrethroids are synthetic insecticides utilized in agriculture and in the urban environment to control pathogens, aiming at the healthy well-being of humans and other animals (Go *et al.*, 1999; Larini, 1999). Despite the advantages in 2005, the IARC included the pyrethroid pesticides, principally deltamethrin and cypermethrin, in group 3, that is, not conclusive for carcinogenic potential, both in epidemiological research and in the experimental model, while the WHO classifies deltamethrin as a moderately dangerous insecticide, with its daily acceptable dose being 0.010 mg/kg).

The results obtained in the present study detected 40% presence of pyrethroid pesticides in adipose tissue of female dogs with mammary cancer. Among these were tetramethrin, deltamethrin, cyalothrin, allethrin and cypermethrin. Of these five pyrethroid types detected, two are included in the high-risk list, both of the IARC and EPA, although these regulatory organizations did not conclude what exposure level constitutes carcinogenic potential. In the present research, it is extremely important that these contaminants had been detected and identified in tumors classified as higher aggressiveness degree. These tumors have the capacity to survive and multiply indefinitely, invading neighboring tissues and promoting metastases.

Despite the reduced animal number in the sample, it appears that these pesticides interfere in the biological behavior of these neoplasias. To give consistency to this reduced number, a statistical method was chosen that provides a future estimate of pyrethroid contamination level of individuals found in the present study.

There are epidemiological investigations on women in relation to the role of anthropometric measures including weight or body mass index, weight gain, topographic localization of adipose tissue related to the risk of neoplasia development in the breast. (Mathé, 2000). Similarly, it has already been demonstrated that when thin female dogs exhibit lower incidence of mammary tumor development than their obese counterparts, nutritional factors can thus be involved in developing tumors (Pinotti and Teixeira, 2000; Jericó and Scheffer, 2002; Streiff et al., 2002). In the present study, the results are in accord with those found by the authors already cited, given that the animal of greatest body weight (33.8kg) presented mammary cancer of the highest aggressiveness degree (Degree III). Furthermore, this animal presented one more aggravating factor besides detection and identification of the different pyrethroids such as deltamethrin (0.55µg/g) and cyalothrin (0.32µg/g). As already commented, deltamethrin is included in group 3 by the IARC and as inconclusive in relation to its potential role in the process of chemical carcinogenesis. Yet the WHO classifies the same chemical compound as a moderately dangerous insecticide. This result corroborates the association of factors in the mammary carcinogenesis process in the female dog.

Conclusions

The High Precision Liquid Chromatography (HPLC) methodology adapted to detect, identify and dose the environmental contamination levels in adipose tissue adjacent to carcinoma in the female dog was shown to be appropriate for determining the degree de environmental contamination in female dogs that develop mammary tumor. Considering that the highest degree

of carcinoma aggressiveness was in animals that exhibited the greatest degree of environmental contamination and that these data were supported by statistical methods for the current results, as well as by a future estimate, an association can be established between the presence of pyrethroids and the biological behavior of the tumor. Considering that the major proportion of neoplasias is attributed to environmental factors, among them the chemical substances studied in the present work, it was demonstrated that the dog, the inseparable friend of mankind, by sharing the same environment, can serve as a comparative model to aid in the identification and control of indiscriminate use of these pyrethroids, which would enable prevention of the majority of neoplasias or better understanding of strategies for treating such cancers.

References

- Amorim, L. da Fonte, Rossini A, Mendonca G, Lotsch P, de Almeida Simao T, de Moura Gallo C, et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. **Cancer Lett.** (2002) 181(2):179-186.
- Bissacot, D. Z.; Vassilieff, I. (1997) HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in milk and blood of lactating dairy cows. **Jour. Anal. Toxic.** v. 21, p. 397-402.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Roszel, J.R. (1983). Canine mammary gland neoplasms. **Jour. Amer. Ani. Hosp. Assoc.**, 19, 61-69.
- Burini, C. H. P. (2002) **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer de mamário de cadelas sem raça definida**. 162p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu.
- Cassali, G. D. (2000) **Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela: aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 80p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Christine, I.; John E. Bauer (2002) A Comparison of the Nutritional Adequacy of Home-Prepared and Commercial Diets for Dogs. American Society for Nutritional Sciences. **J. Nutr.** 132: 1698S–1700S.
- Daleck C.R., Franceschini P.H., Alessi A.C., Santana A.E. & Martins M.I.M. (1998). Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. **Ciência Rural**. 28: 95-100.
- Environmental Protection Agency – EPA. (2006) Health Effect Division. Office of Pesticide Programs. **Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential**. Informative., p.49.
- Erin L. Streiff; Bettina Zwischenberger; Richard F. Butterwick; Elisabeth Wagner; Christine Iben; John E. Bauer. (2002) A Comparison of the Nutritional Adequacy of Home-Prepared and Commercial Diets for Dogs. American Society for Nutritional Sciences. **J. Nutr.** 132: 1698S–1700S.
- Ferreira, E.; Cassali, G. D. (2003) Levantamento dos tumores mamários em cadelas no hospital veterinário da EV/ UFMG. In: XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária – Botucatu/SP. **Anais...**, p. 258.
- Fonseca, C. S. (1999) **Avaliação dos níveis séricos de 17-β Estradiol e Progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias**. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista. 87p. Dissertação de Mestrado – Área de Cirurgia Veterinária.
- Fonseca, C. S.; Daleck, C. R. (2000) Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciênc. Rur.**, v. 30, n. 4, p. 731-735.
- Garey, J.; Wolff, M. (1998) Estrogenic and antiprogesteragenic activities of pyrethroid insecticides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 251, p. 855-859.

- Gilbertson S. R., Kurzman I. D., Zachrau R. E., Hurvitz A. I., Black M. M. (1983) Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphological characteristics assessed in 232 dogs. **Vet. Pathology**; 20: 127-142.
- Go, V.; Garey, J.; Wolff, M. S.; Pogo, B. G. T. (1999) Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, p. 173-177.
- Goulart, S. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Queiroz, J. H.; Alves, I. C. (2004) **Anais da 27 Reunião Anual da SBQ e 26 Congresso Latino Americano de Química**, Salvador, Ba.
- Hamilton, J. M.; Else, R. W.; Forshaw, P. (1997) Oestrogen receptors in canine mammary tumours. **Vet. Rec.**, v. 101, p. 258-260.
- Hampe, J. F.; Misdorp, W. (1974) Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bull. Wor. Heal. Org.**, v. 50, p. 111-133.
- Hataka, A. (2004) **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia**: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. 90 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Instituto Nacional de Câncer. (2006) Ministério da Saúde. Estimativa para 2005 da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA.
- International Agency For Research Cancer – IARC. (2005) **Overall evaluations of carcinogenicity to humans**. Lyon: IARC, 1987. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>>. Acesso: 22 ago.
- Jericó, M. M.; Scheffer, K. C. (2002) Aspectos epidemiológicos dos cães obesos na cidade de São Paulo. **Clin. Vet.**, n. 37, p. 25-29.
- Johnston, S. D. (1993) Reproductive systems oncology. In: SCATTER, D. **Text book of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders Company. v. 2, p.2177-2200.
- Klaassen CD, ed. (2001). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed., p. 784-787 New York:McGraw-Hill.
- LARINI, Lourival. (2000) Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Manole, 230 p.
- MacEwen E. G. (1990) Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Review* 9 125–136.
- MacEwen, E. G., Withrow, J. S. (1996) Tumors of the mammary gland. In: _____. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Saunders. p. 356-72.
- Mariconi, F. A. M. (1980) **Inseticidas e seu emprego no combate as pragas**. vol 1, 4ª edição, Livraria Nobel, São Paulo.
- Mathé, G. (2000) Obesity not only holds cardiovascular diseases, it also hold tumors. **Biom. Pharmacoth.**, v. 54, n. 2, p. 67-68.
- Matos G .B., Santana O. A. M., Nobre L.C.C. (2002) **Intoxicação por agrotóxico**. In: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde; Secretaria da Saúde do Estado. Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador. Salvador (BA): CESAT/ SESAB. p. 249-280.

- McKee, G. T. (1997) **Citopatologia**. São Paulo: Ed. Arts Médicas, 361 p.
- Morrison, W. B. (1998) Paraneoplastic syndromes and the tumors that cause them. In: _____. **Cancer in dogs and cats**. Baltimore: Williams & Wilkins. cap.50, p. 763-778.
- Moulton, J. E. (1990) Tumors of the mammary gland. In: _____. **Tumors in domestic animals**. 3ed., Los Angeles: University of California Press. cap. 12, p.518-552.
- Najera Ja, Zaim M. (2001) Malaria vector control: insecticides for indoor residual spraying. Geneva: World Health Organization.
- Nerurkar V. R., Chitale A. R., Jalnapurkar B. V., Naik S. N., Lalitha V. S. (1989) Comparative pathology off canine mammary tumors. J. **Comp. Pathology**, v 101, p 388-397.
- O'Brien, D. J. (2000) Spatial and temporal comparison of selected cancers in dogs and humans, Michigan, USA, 1964-1994. **Prev. Vet. Med.**, v. 47, p. 187-204.
- O'Keefe, D. A. (1997) Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. SÃO Paulo: Manole. v. 2, p. 2344-2351.
- Oliveira, L. O.; Oliveira, R. T.; Loretto, A.; Rodrigues, R.; Driemeier, D. (2003) Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Act. Sci. Vet.** v. 31, p. 105- 110.
- Organización Mundial de la Salud. (1976) Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas: Comité de expertos en Insecticidas. 22º Informe, **WHO** Serie n.º 585, Ginebra: WHO.
- Peleteiro, M. C. (1994) Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 89, n. 509, p. 10-29.
- Pinotti, J. A.; Teixeira, L. C. (2000) Câncer de mama: Importância, epidemiologia e fatores de risco. In: _____. **Tratado de ginecologia**. 3 ed. v. 3. São Paulo: Roca. cap. 180, p. 2019-22.
- Queiroga F. and Lopes, C. (2002) Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.97, p. 119-127.
- Raskin, R. E. and Meyer, D. J. (2003) **Atlas de Citologia de Cães e Gatos**. 3 ed. São Paulo: Roca, p. 233-243.
- Schneider, R., Dorn, C. R., Taylor, D. O. N. (1969) Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p. 1249-61.
- Soremno, K. (1998) An update on canine mammary gland tumors. In: ACVIM Forum, 16, **Proceedings**, p. 387-388.
- US EPA. (2004). Pyrethrins: Report of the Cancer Assessment Review Committee. Third Evaluation. OPP-2005-0043-0010. <http://docket.epa.gov/edkpub/do/EDKStaffItemDetailView;jsessionid=E940D9EFD89989002984FA680928D8E2?objectId=090007d48075c538>
- Wright, J. W. (1971) The WHO programme for the evaluation and testing of new insecticides. **Bull. Wld. Hith. Org.**, **44**: 11-22.

Zuccari, D.A.P.C. (1999) **Contribuição ao estudo imunohistoquímico dos tumores mamários em cadelas.** Jaboticabal - SP, Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Jaboticabal. 121p. Dissertação de mestrado, Patologia Animal.

Figure Captions

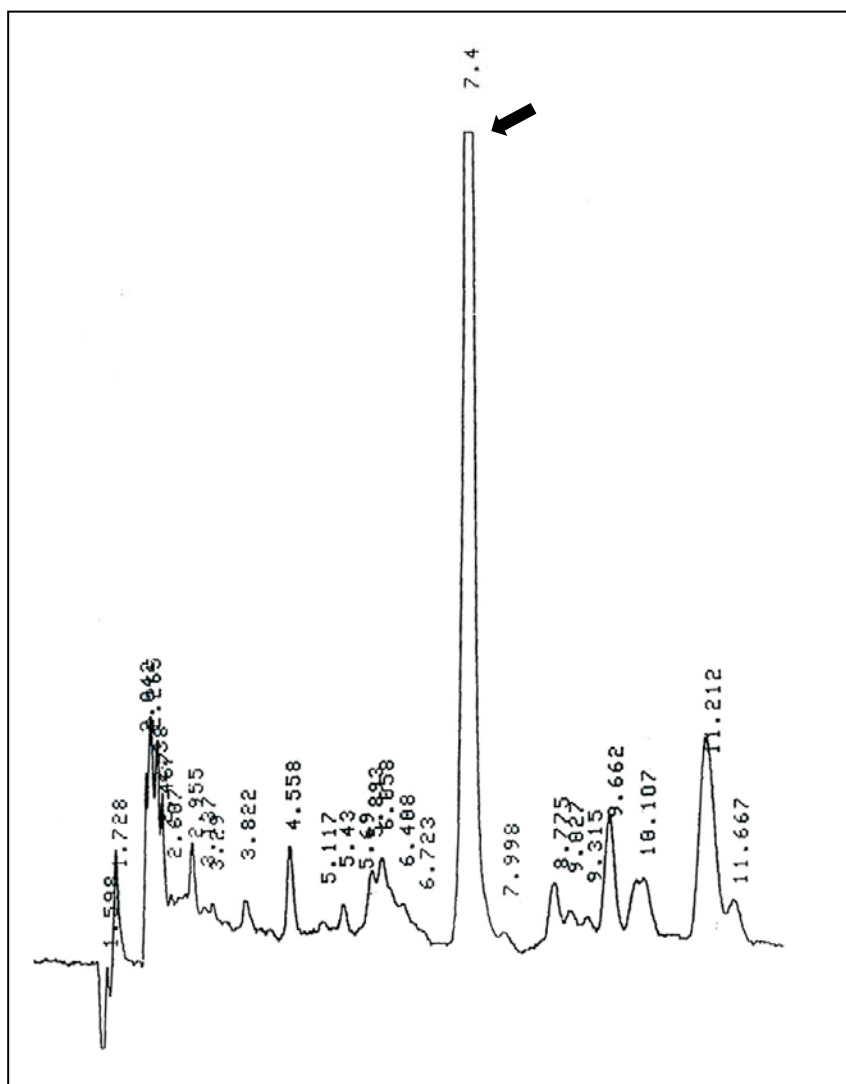
Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.

Graphic 1 - Chromatogram HPLC: female mongrel, 9 years old, 29,14lb. Pyrethroid Tetramethrin Inseticide identification in adipose sample adjacent to the breast tumor (simple carcinoma) indicated by the arrow (time of retention = 7,4')

Table 1- Summary presentation and schematic of results of parameters analyzed at the end of the study.

Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.

Graphic 1



Detection of Pyrethroid Insecticides in Adipose Tissue of Malignant Tumor Mammary Gland of in the Female Dog.

Table 1

N	Breeds	Age (years)	Weight (kg)	Malignant Tumor (%)	Pyrethroids (µg/g)
5	Mongrel*	11,04 ± 2,12	15,40 ± 8,34	100	1,55
3	German Shepherd	9,53 ± 2,34	29,47 ± 4,40	100	0,87
1	Cocker Spaniel	9,0	12,20	100	0,00
1	Teckel / Dachshund	12,0	5,20	100	0,00

* undefined breed.