

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

RESÍDUOS DE PIRETRÓIDES NO TECIDO ADIPOSEO
ADJACENTE AO CARCINOMA ESPONTÂNEO DE MAMA
EM CADELA.

MARIO HENRIQUE BARIANI

Botucatu – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

RESÍDUOS DE PIRETRÓIDES NO TECIDO ADIPOSEO
ADJACENTE AO CARCINOMA ESPONTÂNEO DE MAMA
EM CADELA.

MARIO HENRIQUE BARIANI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Adj. Dr^a Noeme
Sousa Rocha

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago - CRB 8/4716*

Bariani, Mario Henrique.

Resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente ao carcinoma espontâneo de mama em cadela / Mario Henrique Bariani. - 2010

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Capes: 50503022

1. Cão - Doenças. 2. Câncer de mama em cão 3. Cão - Efeito dos produtos químicos

Palavras-chave: *Cadela; Carcinoma de Mama; Massa corporal; Piretróides*

Nome do Autor: Mario Henrique Bariani

Título: RESÍDUOS DE PIRETRÓIDES NO TECIDO ADIPOSEO ADJACENTE AO CARCINOMA ESPONTÂNEO DE MAMA EM CADELA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Domingos José Sturion
Membro
Departamento de Clínica Cirúrgica e Diagnóstico por Imagem
Fundação Educacional Miguel Mofarrej – Ourinhos/SP

Prof.Dr. Alaor Aparecido Almeida
Membro
Departamento de Centro de Assistência Toxicológica Ceatox.
Instituto de Biociências, UNESP/ Botucatu-SP

Data da Defesa: 28 de junho de 2010.

“Ao Deus que me reveste de força e
torna perfeito o meu caminho”

Salmos de Davi- SL 18:32

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus pelo dom gracioso da vida, infinita graça e misericórdia.

À minha esposa, Tracy Anne Smith Bariani, pelo amor, cuidado, cumplicidade, paciência e co-autoria desse trabalho. A você, mais uma vez, toda minha gratidão e o meu amor eterno.

Aos meus pais, Mário Bariani e Elfride Ana Célia Santos Bariani, por cada palavra de incentivo, carinho e afeto. Amo vocês.

Ao meu irmão Marcelo Augusto Bariani pela sua amizade e por compartilhar os melhores momentos da minha vida.

A minha irmã Ana Paula Guth Bariani Lima meu cunhado Samuel Pereira de Lima e meus Sobrinhos “Cadu” e “Teté” pela torcida e apoio.

Às minhas avós Amara Rufino Alves e Elisabeth Maria Guth e minha tia Marilene Aparecida Bariani, pelo auxílio, confiança, amor e cuidado durante toda minha jornada.

To my in-laws Robert and Rebecca Smith, my sisters and brother in-law: Nikki, Cassie and Josh; who believe and support me in prayer.

Aos professores André Luis Filadelpho, Antônio Luiz Scalzo e Paulo César Gonçalves do Santos, pelo exemplo de profissionalismo, caráter, amizade e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos Maury Raul, Noel Melo e João Leandro (Ceatox) pelas dicas, paciência e atenção no desenvolvimento do meu trabalho e na formação do profissional que sou.

Aos pós-graduandos, Ana Paula Maceno, Arita de Cássia Marella Cremasco, Erika Maria Terra, Rodolfo Françon Araujo Ventura, Luciano Santos da Fonseca, Sandra Bassani, Marcela Marcondes, Camila Porto, Leandro Bertoni, Pedro Pinczowski e Mariana Marras Vidale pelos momentos de companheirismo, espírito de corpo e harmoniosa convivência.

Em especial aos meus amigos Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, Marcia Moleta Colodel, Isabelle Ferreira, Fernanda Carmello Figueroa e Fabio Henrique Evangelista pela auxilio, paciência, estímulo, orientação e colaboração na síntese e execução deste trabalho. Sou grato a cada um de vocês.

Aos docentes e residentes amizade e companheirismo no cotidiano do Serviço de Patologia desta FMVZ/UNESP.

Aos companheiros Didier Quevedo Cagnini e Gabriel Monteiro pela amizade, suporte e motivação em momentos de necessidades. Parte desse trabalho devo a vocês, nobres amigos.

A meu grande amigo Freddi Bardela de Souza, pelo companheirismo ao logo dessa nossa jornada. Sou grato a você por tudo que fez e por Deus por permitir que pudéssemos trilhar esse caminho juntos até o presente momento.

Aos professores Domingos José Sturion, Tiago T. Sturion, Marco Aurélio T. Sturion pela amizade e auxilio no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. Jorge Luiz da Costa pela ajuda na coleta de material e principalmente por estimular o desejo de ultrapassar os meus próprios limites.

A minha orientadora Noeme Sousa Rocha, que esteve comigo em momentos de adversidade me ajudando a encarar meus problemas com responsabilidade, vencê-los com garra e humildade. As lágrimas de passado hoje são lembradas como motivo de alegria, honra e satisfação.

A todos os que auxiliaram na minha formação profissional. Sou grato à cada um de vocês.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Características utilizadas para classificação de tumores de mama em cadelas conforme o grau de malignidade. **Fonte:** MISDORP, 1999. 10
- Figura 2** - Estrutura química dos piretróides (A) cipermetrina (B) permetrina, (C) deltametrina, e (D) metabólito. **Fonte:** SANTOS, *et al.*, 2007..... 14
- Figura 3** - Vias de metabolização dos piretróides em mamíferos por hidrólise ([H]), oxidativo ([O]) e reações conjugadas. **Fonte:** SODERLUND *et al.*, 2002. 17
- Figura 4** - Caracterização da composição corporal estabelecido pela Hill's. **Fonte:** Hill's 1999. 24
- Figura 5** - Distribuição da frequência de carcinoma mamário por idade do Grupo 1.. 29
- Figura 6** - Distribuição da frequência de cadelas classificadas por idade do Grupo 2..... 29
- Figura 7** - Comparação entre os níveis de resíduos de piretróides encontrado no tecido adiposo adjacente a mama e a massa corporal das cadelas do grupo 1 e 2. 31
- Figura 8** - Distribuição dos carcinomas de mama avaliados (n=30) conforme o tipo histológico, segundo a classificação da OMS **Fonte:** MISDORP, 1999..... 32

- Figura 9** - Exame histológico: densa camada de estroma (E), que envolve o parênquima mamário (seta) e tecido adiposo adjacente (A). Cadela de 10 anos, sem resíduos de piretróides detectados. H.E. 2,5X..... 33
- Figura 10** - Exame histológico: parênquima mamário produtivo com diversos ácinos (seta), pouco estroma (E) e tecido conjuntivo denso (asterisco). Cadela de 13 anos, detectado 1,89 µg/g de aletrina; 0,07 µg/g de cipermetrina e 0,12 µg/g de deltametrina no tecido adiposo adjacente ao tecido mamário . H.E. 2,5X..... 33
- Figura 11** - Exame citopatológico: carcinoma simples de mama de cadela, denota-se a presença de cristais de colesterol (seta), entre células epiteliais neoplásicas. Papanicolaú, 40X..... 34
- Figura 12** - Exame histopatológico: carcinoma simples de mama de cadela, denota-se a presença de cristais de colesterol (seta), entre células epiteliais neoplásicas formando arranjos alveolares.H.E., 40X..... 34
- Figura 13** - Exame citopatológico: carcinoma complexo de mama em cadela: componentes celulares epiteliais e mesenquimais, presença de células fusiformes que lembram mioepiteliais (seta). Papanicolau, 20X..... 35
- Figura 14**- Exame histopatológico: carcinoma complexo de mama em cadela; proliferação acinar de células epitelial neoplásica, circunscrito por tecido mixóide amorfo (seta). H.E, 20X. 35

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Animais dos grupos 1 e 2 que apresentavam níveis de piretróides tecido adiposo adjacente a mama dividida em relação massa corpórea e ambiente rural e urbano..... 30
- TABELA 2** - Comparação entre os níveis de resíduos de piretróides detectados e quantificados no tecido adiposo adjacente a mama das cadelas dos grupos 1 e 2. 31
- TABELA 3** - Classificação histológica de carcinomas e graduação conforme o grau de malignidade..... 36
- TABELA 4** - Comparação entre frequência da localização do carcinoma na mama e a massa corporal dos animais do grupo 1..... 36
- TABELA 5** - Comparação entre os grupos G1 e G2 da frequência de animais que apresentavam resíduo de piretróide no tecido adiposo adjacente a mama. 37
- TABELA 6** - Análise da mediana para cada piretróide identificado nos grupos. 37
- TABELA 7** - Comparação entre os níveis de piretróides nos carcinomas diagnosticado no Grupo1..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACEG = ASSOCIAÇÃO CULTURAL E EDUCACIONAL DE GARÇA

ACTH= HORMÔNIO ADENOCORTICOTRÓFICO

CEATOX = CENTRO DE ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA

CN= CIANO

DNA= ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

E2 = ESTRADIOL

EOA= ESPÉCIE ATIVA DE OXIGÊNIO

EPA = ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY

ER= RECEPTORES DE ESTRÓGENO

ERO= ESPÉCIE REATIVA DO OXIGÊNIO

FAMED = FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DE GARÇA

FMVZ = FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

FSH= HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE

GABA= ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO

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

IARC = INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER

INCA = INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

IPCS= INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY

LH= HORMÔNIO LUTEINIZANTE

P2= PROGESTERONA

PRL=PROGESTERONA

RNA= ÁCIDO RIBONUCLÉICO

SRD = SEM RAÇA DEFINIDA

UNESP = UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

WHO = WORLD HEALTH ORGANIZATION

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Origem e desenvolvimento da mama	3
2.2 Carcinogênese	5
2.2.1Carcinogênese química	7
2.2.2Carcinogênese hormonal	8
2.3 Neoplasias de mama espontâneas em cadelas.....	9
2.4 Piretróides como contaminantes ambientais	12
2.5 Possíveis atuações dos piretróides no carcinoma de mama espontâneo em cadelas	19
2.6 Determinações dos piretróides por HPLC.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Aquisição dos Animais	23
4.2 Procedimento	23
4.3 Análise da condição corporal	23
4.4 Coleta e processamento de material	24
4.5 Análise Estatística.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Freqüência de raças e idade.....	28
5.3 Análise da condição corporal e o resíduo na gordura	30
5.4 Distribuição anatômica e análise morfológica	32
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	46
8. PERSPECTIVAS	47
9. REFERÊNCIAS	48
10. TRABALHO CIENTÍFICO	62
ANEXOS	84

BARIANI, M.H. **Resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente ao carcinoma espontâneo de mama em cadela.** 2010. 85f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

O carcinoma espontâneo de mama representa cerca de 50% de todas as neoplasias malignas que acometem a cadelas adultas e demonstram semelhanças ao câncer de mama em mulheres. A exposição humana e de outros animais a contaminantes ambientais podem estar associados ao desenvolvimento do câncer de mama. O objetivo foi identificar resíduos dos piretróides aletrina, lambda- cialotrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina no tecido adiposo adjacente de tumores malignos em mama de cadelas com e sem tumor espontâneo, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e correlacionar com a expressão morfológica e o grau de agressividade dos tumores por meio do exame histopatológico. Foram utilizadas 60 cadelas sem predileção por raça, de idade superior a cinco anos. Esses animais foram distribuídos em dois grupos de 30 animais. Grupo 1: cadelas com diagnóstico citopatológico e histopatológico de carcinoma espontâneo de mama; G2: cadelas sem diagnóstico de tumor de mama. Em ambos, foram colhidos 5 gramas de tecido adiposo adjacente ao tecido mamário, que permaneceu em refrigeração (-4°C) até o momento da análise pela técnica de HPLC. Para o diagnóstico e classificação das neoplasias utilizaram-se os critérios da Organização Mundial da Saúde. Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$); entretanto quando comparado o nível de piretróides entre os carcinomas do Grupo 1, verificou-se a prevalência significativa ($P < 0,05$) nos carcinomas complexo em relação aos simples. O presente resultado sugere a probabilidade dos resíduos de piretróides como contaminantes ambientais possam estar envolvidos no processo de desenvolvimento do carcinoma de mama em cadela.

Palavra Chaves: Cadela; carcinoma de mama; piretróides; massa corporal.

BARIANI, M.H. Residues of pyrethroids in the adipose tissue adjacent to spontaneous mammary carcinoma in female dogs. **2010. 85f. Dissertation (Masters) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.**

ABSTRACT

Spontaneous mammary carcinoma represents about 50% of all the malignant neoplasias that assail adult female dogs and it demonstrates similarities to breast cancer in women. The exposure of humans and other animals to environmental pollutants can be associated to the development of breast cancer. The objective was to identify residues of the pyrethroids alethrin, lambda-cialothrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin in the adipose tissue adjacent to malignant tumors in the mammary gland of female dogs with and without spontaneous tumor by High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC) test; to correlate the results with the morphologic expression and the degree of aggressiveness of the tumors through the histopathology exam. Sixty female dogs were used without predilection of race, at or superior to five years of age. The animals were divided in two groups: G1- 30 female dogs with cytopathologic and histopathologic diagnosis of spontaneous mammary carcinoma and G2- 30 female dogs diagnosed without mammary tumors. In both, 5 grams of adipose tissue adjacent to the mammary gland was collected, and was refrigerated at (-4°C) until the moment it was analyzed by the HPLC technique. For the diagnosis and classification of the neoplasias the criteria from the World Organization of Health were used. There was no significant difference among the groups ($P > 0,05$); however when compared the level of pyrethroids among the carcinomas of Group 1, the significant prevalence was verified ($P < 0,05$) in the compound carcinomas in relation to the simple. The present results suggest the probability that residues of the pyrethroids as environmental pollutants can be involved in the process of mammary development carcinoma in female dog's mammary gland.

Key Words: Female dogs; mammary carcinoma; pyrethroids; body mass.

1. INTRODUÇÃO

O termo agrotóxico é utilizado genericamente para descrever substâncias químicas naturais ou sintéticas, responsáveis pelo combate de parasitas nas lavouras. São classificados de acordo com a sua atuação como pesticidas, herbicidas, inseticidas, fungicidas e raticidas (CALDAS e SOUZA, 2000; JOBIM *et al.*, 2010).

Desenvolvido inicialmente para ser um defensivo agrícola, atualmente o seu uso está difundido, abrangendo, por exemplo, produtos domissanitários, no controle de ectoparasitas em animais domésticos e nas Campanhas de Saúde Pública. Embora amplamente disseminada devido à praticidade, fácil acesso e importância econômica, essas substâncias são potencialmente tóxicas e seus resíduos podem estar presentes no ambiente (PRESIBELLA, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2010).

Na última década, o possível efeito deletério à saúde frente a exposição prolongada a estes resíduos tem sido motivo de preocupação crescente. Estudos demonstram que tais substâncias podem ser persistentes ou bioacumulativas, capazes de alterar a fisiologia celular, atuando no processo da carcinogênese e/ou responsáveis por modular ou desregular o sistema endócrino (LEMOS, 2001; McCARTHY *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; ANADÓN *et al.*, 2009; JOBIM *et al.*, 2010).

Entre os resíduos dos agrotóxicos que podem contaminar o meio ambiente, o grupo dos piretróides recebe destaque, por serem os inseticidas mais utilizados em todo mundo, embora pouco seja feito para avaliar seu potencial como desregulador hormonal (GAREY e WOLF, 1998; KASAT *et al.*, 2002), sendo listado como tal por agências internacionais como a Environmental Protection Agency (EPA), responsável pela regulamentação e fiscalização de substâncias químicas nos Estados Unidos (EPA, 1997).

A literatura relata de forma contraditória, como os níveis residuais de piretróides possam simular a ação do estrógeno, atuando assim de forma efetiva

como precursores de doenças consideradas hormônio dependentes, comprometendo o sistema imune, o desenvolvimento do sistema neurológico em mamíferos, aumentando o índice de criptorquidismo e conseqüentemente reduzindo a produção de espermatozoides, no desenvolvimento de câncer testicular e tumores de mama (GAREY e WOLF, 1998; SANTOS *et al.*, 2007; ANADÓN *et al.*, 2009).

Os animais de companhia compartilham do mesmo ambiente que os seres humanos, tornando-os suscetíveis aos resíduos dos mesmos contaminantes. Particularmente os cães, por possuírem um maior grau de genes homólogos aos dos seres humanos, são acometidos por doenças hormônios dependentes similares (THOMAS *et al.*, 2003; LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; BREEN *et al.*, 2008).

O carcinoma espontâneo de mama em cadelas está entre as doenças em que hormônios esteróides femininos podem estar envolvidos no seu desenvolvimento. Esta neoplasia e seu estudo são de extrema importância, pois representa cerca de 50% de todas as neoplasias malignas que acometem as cadelas adultas e demonstram semelhanças clínica, biológica e epidemiológica ao câncer de mama em mulheres (FONSECA e DALECK, 2000; SORENMO, 2003), tornando um excelente modelo comparativo para o entendimento dos vários aspectos da carcinogênese em ambas as espécies (PELETEIRO, 1994; LAFFIN *et al.*, 2009; KOOISTRA *et al.*, 2009; UVA *et al.*, 2009).

Considerando os aspectos citados, percebe-se a necessidade de maiores estudos na atuação de piretróides como disruptores endócrinos e possivelmente agentes cancerígenos. O objetivo deste trabalho é identificar e estabelecer níveis de resíduos dos piretróides aletrina, cipermetrina, deltametrina, tetrametrina e lambda- cialotrina no tecido adiposo adjacente ao tecido mamário de cadelas com e sem carcinoma, para que se possa averiguar a possível relação deste contaminante na carcinogênese mamária.

2. Revisão de Literatura

2.1 Origem e desenvolvimento da mama

A mama é proveniente da modificação e especialização evolutiva das glândulas sudoríparas que originam-se, embrionariamente, do espessamento linear bilateral do ectoderma denominado de linhas lácteas ou cristas mamárias, onde se forma os botões que dão origem a porção funcional desse tecido (DYCE *et al.*, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A cadela em média possui cinco pares de mamas, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais; dispostas em alinhamento bilateral estendido da região torácica ventral à inguinal. De acordo com sua morfologia, são classificadas como apócrinas túbulos alveolares compostas formadas por lóbulos separados por septos conjuntivos, nos quais pequenos ductos drenam para canais secretores mais calibrosos, denominados ductos lactíferos, que se dilatam gradativamente formando os seios lactíferos antes de se abrirem no mamilo (EVANS, 1993; KÖNING e LIEBICH, 2004).

O epitélio de revestimento dos ductos é formado por uma dupla camada de células cúbicas que se transforma em simples à medida que vão se ramificando para formar ductos intralobulares. Os ductos intralobulares conectam o epitélio secretor (parênquima), envolvidos por tecido conjuntivo, adiposo, vasos e nervos (estroma), sustentados por uma cápsula fibroelástica (MOORE e PERSAUD, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O parênquima é formado por uma única camada de células epiteliais secretoras, denominados alvéolos mamários. Estes são recobertos por células contráteis de natureza mioepitelial, responsivas ao reflexo de ejeção e drenagem do leite, por meio de ductos, controlados pela ação de hormônios (CUNNINGHAM, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Todas as mamas possuem drenagem linfática independente para o linfonodo regional mais próximo. Entretanto, alguns animais apresentam ligação da entre a glândula abdominal cranial e a abdominal caudal promovendo o contato de algumas glândulas homolaterais (PELETEIRO, 1994; ZUCCARI *et al.*, 2001).

O suprimento sanguíneo das mamas torácicas é realizado pelos ramos cutâneos das artérias intercostais, enquanto as mamas abdominais e inguinais são irrigadas pelos ramos das artérias torácicas laterais e epigástricas superficiais, sendo que o percurso das artérias são os mesmos das veias (DIDIO, 1998; LUIZ *et al.*, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A inervação dos conjuntos mamários torácicos é realizada pelos nervos subcutâneos laterais enquanto as abdominais e inguinais são inervadas pelo feixe superficial ventral dos três primeiros nervos lombares (LUIZ *et al.*, 2002).

A interação hormonal é complexa, ocorre a partir do desenvolvimento fetal e perdura por toda à vida do animal, determinando as diferentes fases do desenvolvimento do tecido da mama (SHIDA *et al.*, 2001; MOORE e PERSAUD, 2004).

Na fêmea impúbere ela é formada por um sistema tubular ramificado rudimentar, ligado aos ductos lactíferos. Durante a puberdade as mamas ficam em estado latente, nesse momento os alvéolos verdadeiros começam a formar-se a partir do sistema glandular juvenil, substituindo o tecido adiposo que preenchia internamente o órgão; com discreto aumento de células adiposas, sobretudo nas abdominais caudais e inguinais. Nesta fase hormônios gonadotróficos hipofisários como o hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), estimulam o crescimento do tecido da mama, a maturação sexual e regula o ciclo estral das fêmeas (ZUCCARI *et al.*, 2001; CUNNINGHAM, 2004).

Em cadelas gestantes, os estrógenos (E2) atuam no crescimento e diferenciação do sistema mamário, estimula a síntese de DNA, RNA ou proteínas e produzem crescimento extensivo de seus ductos. Possuem ação sinérgica com a progesterona (P2), promovendo a multiplicação de células epiteliais da mama. À medida que a gestação avança, aumenta os receptores celulares para E2 e P2,

mudança induzida pela prolactina (PRL) (CUNNINGHAM, 2004; DYCE et al., 2004).

O processo de crescimento das mamas ocorre de forma crítica no final da gestação, quando a profunda integração endócrina direciona os processos metabólicos para obter hipertrofia e diferenciação celular do sistema glandular e do tecido de suporte preparando a glândula para iniciar os processos de síntese bioquímica dos diferentes componentes de sua secreção após o início da lactogênese (PELETEIRO, 1994; DYCE *et al.*, 2004).

Durante a fase de lactação a regulação hormonal induz, modula ou bloqueia os diferentes eventos relacionados com a lactogênese. Sabe-se que PRL, hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e E2 iniciam a lactação e a P2 inibe a lactogênese. Basicamente a lactação é controlada com a ação de três fatores: o número de células, a atividade sintética das células epiteliais e a manutenção de um eficiente reflexo para a ejeção do leite. Quando termina a lactação, a maioria dos alvéolos são reabsorvidos e a mama diminui de volume (DYCE *et al.*, 2004; STERNLICHT, 2006).

Dessa forma, as mamas se diferem e evoluem repetidamente a cada ciclo. Assim sendo, as constantes modificações organizacionais do tecido glandular, podem levar ao desenvolvimento de alterações neoplásicas, em qualquer local desse tecido, mas especialmente na região epitelial (ZUCCARI *et al.*, 2001; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

2.2 Carcinogênese

Carcinogênese é um termo genérico utilizado para descrever o processo complexo de desenvolvimento anormal, ativo e descontrolado de uma neoplasia, envolvendo as funções de proliferação, diferenciação e morte celular. Este processo caracteriza-se por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais,

denominados carcinógenos (COTRAN *et al.*, 2000; BRASILEIRO-FILHO, 2004; FRANCO *et al.*, 2010).

Em regra, o desenvolvimento das neoplasias seguem quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica. As duas primeiras ocorrem durante a fase de latência, no intervalo entre a exposição ao cancerígeno e o aparecimento de lesões neoplásicas visíveis (PITOT e DRAGAN, 1991; COOPER, 1995; MAREEL e LEROY, 2003; JOBIM *et al.*, 2010).

A iniciação é marcada pela exposição das células aos carcinógenos com consequente mutação e formação de clones celulares atípicos por meio de alterações irreversíveis no DNA, desencadeando uma série de eventos extra e intracelulares. As células iniciadas não possuem graus de proliferação celular autônoma, no entanto, durante a promoção do tumor, o material genético modificado da célula iniciada, altera a expressão de genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular, resultando em aumento reversível da proliferação e expressão genética das células iniciadas (DRAGAN e PITOT, 1992; SURH, 2003; BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Diferente do estágio de iniciação, a promoção pode ser continuamente modulada por diversos fatores como a frequência de contato com o agente promotor, idade, sexo e dieta. Neste estágio, devido ao longo período de latência e a possibilidade de modulação por fatores ambientais, os agentes quimiopreventivos tornam-se mais eficazes como forma de tratamento (PITOT e DRAGAN, 1994; FRANCO *et al.*, 2010).

O estágio da progressão é caracterizado pela continuação do desenvolvimento neoplásico, por meio de alterações bioquímicas e estruturais das células que ocasionam a instabilidade genômica, o aumento da velocidade de crescimento e a invasão das células neoplásicas. Nessa etapa, as células pré malignas tornam-se malignas em um processo irreversível, decorrente de alterações nos cromossomos. Estas modificações resultam na multiplicação celular incontrolada (PITOT e DRAGAN, 1991; BRASILEIRO-FILHO, 2004) devido à reduzida dependência dessas células aos fatores de crescimento, bem como

menor capacidade para apoptose (COOPER, 1995; RIZZI *et al.*, 1997; MAREEL e LEROY, 2003).

2.2.1 Carcinogênese química

No meio ambiente, os compostos químicos compreendem desde substâncias naturais até aquelas altamente modificados pelo homem. Os carcinógenos químicos são classificados em duas categorias: carcinógenos diretos ou indiretos. Os carcinógenos diretos são substâncias alquilantes ou acilantes com atividade eletrofílica intrínseca, capazes de alterar o DNA celular, causando o câncer diretamente (BOGLIOLO, 1998).

A maioria das substâncias químicas são carcinógenos indiretos, ou seja, precisam primeiro sofrer modificações químicas estruturais pela ação do organismo, para então se tornarem eletrofílicas e ativas. Tais substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade de elétrons, como são as bases do DNA. Se estes carcinógenos se ligarem ao DNA, podem causar mutações, aumentando a probabilidade de erros durante a sua replicação. Alguns carcinógenos químicos além de sua ação mutagênica, ainda inibem a atividade das enzimas reparadoras (BRASILEIRO-FILHO, 2004).

Durante a biotransformação do carcinógeno no processo de carcinogênese química, ocorre a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO) pela cadeia respiratória mitocondrial. O estresse oxidativo que acompanha a metabolização dos carcinógenos causa dano adicional ao DNA, retardam a replicação o qual resulta em divisão celular alterada ou aberrações cromossômicas. As bases alteradas também produzem combinações alteradas de bases durante a replicação ou podem criar seqüências de DNA sem conexões entre as bases, facilitando a separação entre as fitas. Têm-se postulado que todas estas alterações possam propiciar o aparecimento de alteração celular neoplásica (GALIZIA e WAITZBERG, 2001; OBERLEY, 2002).

A atividade potencial de um carcinógeno químico, de fonte endógena ou exógena, depende da sua biotransformação e ativação no organismo. Assim, alterações na expressão de genes ou na atividade de enzimas relevantes para a modificação estrutural dos carcinógenos podem ter forte influência sobre a carcinogênese iniciada quimicamente. Desta forma, os carcinógenos químicos podem provocar tumores sob a atuação de vários fatores, sendo estes do próprio indivíduo e/ou do ambiente (ROSSIT e FROES, 2001).

2.2.2 Carcinogênese hormonal

O termo carcinogênese hormonal foi utilizado pela primeira vez por Bittner (1948), que defendia a hipótese da atuação de hormônios no aumento da incidência das neoplasias.

A carcinogênese dada por hormônios, não necessita de um agente iniciador específico para desencadear a multiplicação celular, diferente do que acontece nas neoplasias induzidas por agentes químicos ou vírus. Todavia, ainda existem controvérsias entre a ação específica de hormônios na gênese das neoplasias hormônio dependentes (MISDORP, 2002; QUEIROGA e LOPES, 2002).

A participação hormonal na carcinogênese, segundo Carreño *et al.* (1999), limita-se na proliferação de células que já estão transformadas por outros agentes carcinógenos. Entretanto para Misdorp (2002), a proliferação celular é induzida por hormônios e conseqüentemente podem ocorrer mutações genéticas que darão origem à célula neoplásica.

Para Osborne e Schiff (2005), os hormônios parecem interagir com os receptores que estão presentes na membrana plasmática e citoplasma, atuando em moléculas sinalizadoras que ativam os fatores de crescimento, resultando na multiplicação celular e transcrição gênica.

Os genes específicos que podem estar envolvidos na progressão neoplásica, ainda permanecem desconhecidos, apesar disso, acredita-se que os genes responsáveis pela supressão tumoral, os oncogenes, e os genes que

reparam o DNA estejam relacionados com a carcinogênese hormonal, principalmente em neoplasias que são induzidas por hormônios sexuais femininos como o E2 e o P2 (HENDERSON e FEIGELSON, 2000; QUEIROGA *et al.*, 2009).

2.3 Neoplasias de mama espontâneas em cadelas

As neoplasias mamárias espontâneas são as mais comuns em cadelas, responsáveis por aproximadamente 50% de todas as afecções neoplásicas nesta espécie (MISDORP, 2002; GUIM *et al.*, 2007; LANA *et al.*, 2007). Calcula-se que entre as neoplasias de mama, as de caráter maligno, representem de 30% a 60% dessas afecções (MISDORP, 2002; QUEIROGA e LOPES, 2002; NARDI *et al.*, 2008).

A incidência de câncer em cadela aumenta com a idade. O risco dos animais desenvolverem essa doença cresce a partir dos cinco anos de idade, sendo 10 anos a idade média de maior incidência. Todas às raças podem ser acometidas, embora alguns autores relatem que há maior incidência em cães de raça pura como o Poodle, Pastor Alemão e Cocker Spaniel (LANA, 2007; NARDI, *et al.*, 2008; PINTO, 2009), no Brasil os animais sem raça definida (SRD) são os mais acometidos (BURINI, 2002; HATAKA, 2004; GUIM, 2007). Em machos esse tipo de neoplasia são raras, porém de extrema agressividade (RUTTEMAN e KIRPENSTEIJN, 2003; ITOH *et al.*, 2005).

O prognóstico para pacientes acometidos por esse tipo de neoplasia depende do diagnóstico preciso nos estágios iniciais da doença (ZUCCARI *et al.*, 2001). Para o diagnóstico primário do tipo tumoral, pode ser realizado o exame citopatológico (ZUCCARI *et al.*, 2001; QUEIROGA e LOPES, 2002; PELETEIRO *et al.*, 2006; RICK *et al.*, 2009). Já exame o histopatológico é o método mais apropriado para a classificação minuciosa das neoplasias mamárias em cadelas, especialmente na caracterização de neoplasias malignas (MISDORP, 1999).

A localização das neoplasias de mama em cadelas são muito variáveis. Os tumores podem aparecer em qualquer um dos pares da mama, embora 60% dos casos se desenvolvem nas mamas abdominais caudais e inguinais, sendo comum

a presença de múltiplos nódulos do mesmo tipo ou de tipos histológicos diferentes (QUEIROGA e LOPES, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; HELLMÉN, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esses tumores podem ser classificados morfológicamente em benignos, malignos, indiferenciados, hiperplasias e displasias mamárias. Entre os carcinomas estão: *in situ*, complexo, simples com subtipos tubulopapilar, sólido e anaplásico e ainda os especiais, que incluem o carcinoma de células fusiformes, escamosas, mucinoso e o rico em lipídios. Existem ainda os sarcomas (osteossarcomas e fibrossarcoma), o carcinosarcoma e os carcinomas e sarcomas em tumores benignos (MISDORP *et al.*, 1999).

A graduação das neoplasias é uma tentativa de avaliar seu grau de malignidade ou agressividade, baseado na caracterização das células tumorais e na quantidade de mitoses (FIGURA 1). O estadiamento das neoplasias consiste na análise do tamanho da lesão primária, presença metástases para linfonodos regionais ou em outros órgãos (FONSECA e DALECK, 2000; LANA *et al.*, 2007).

FIGURA 1 – Características utilizadas para classificação de tumores de mama em cadelas conforme o grau de malignidade.

Características	Escore
<u>1. Formação de túbulo:</u> um ponto para formação de túbulos bem marcada; três pontos para pouco ou nenhuma túbulo	1 2 3
<u>2. Hiper Cromatismo e mitoses:</u> um ponto se uma figura mitótica é vista ocasionalmente; dois pontos se duas ou três figuras são vistas; três pontos se o número é alto	1 2 3
<u>3. Tamanho e forma irregular do núcleo:</u> um ponto se os núcleos são proporcionais em tamanho e forma, três pontos quando o pleomorfismo é marcado	1 2 3
Total do escore	Grau de malignidade
3-5	I
6-7	II
8-9	III

Fonte: Misdorp, 1999

A etiologia dos tumores de mama malignos em cadela ainda não está elucidada, contudo acredita-se que esteja relacionada com interação complexa à susceptibilidade de diversos fatores, sendo estes externos ou internos ao organismo, estando ambos interligados. As causas externas estão relacionadas ao meio ambiente e aos hábitos do animal. Os fatores internos estão associados à capacidade de defesa do organismo frente a agressões externas e são, na maioria das vezes, geneticamente pré determinados. Estes fatores podem interagir de maneiras distintas, aumentando a probabilidade de mutações nas células normais (GATENBY e FRIEDEN, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2008; INCA, 2010).

A dieta também está entre os principais responsáveis pela etiologia e prevenção do câncer, sendo esta, a principal rota de exposição dos animais aos carcinógenos químicos (SORENMO, 2003; BIONDO *et al.*, 2008). Inúmeros são os trabalhos que demonstram fortes evidências do papel protetor de dietas ricas em fibras, vegetais, frutas, grãos e micronutrientes contra alguns tipos de câncer. Em contraste, fatores como a obesidade e alguns ácidos graxos podem aumentar estes riscos (GREENWALD *et al.*, 2001; PARROTT *et al.*, 2009).

O processo pelo qual a obesidade contribui na carcinogênese ainda é pouco claro, todavia o mecanismo proposto para explicar o prognóstico desfavorável associado à obesidade no câncer de mama é a produção excessiva de estrógeno, que ocorre no tecido adiposo pela aromatização da androstenediona (COFFEY, 2001; GREENWALD *et al.*, 2001).

Os hormônios esteróides sexuais femininos podem estar envolvidos no desenvolvimento das neoplasias de mama, como fatores iniciadores ou mesmo promotores, seja estimulando a proliferação celular, ou alterando o genoma das células (FONSECA e DALECK, 2000; MUNSON e MORESCO, 2007; QUEIROGA *et al.*, 2009). A influência hormonal pode ser observada particularmente pelas diferenças significativas de incidência tumoral entre cadelas castradas e não castradas (SILVA *et al.*, 2004; ZUCCARI *et al.*, 2008) e em animais submetidos ao uso prolongado de anticoncepcionais (RUTTEMAN e KIRPENSTEIJN, 2003; LANA *et al.*, 2007).

Nos tumores de mama em cadelas, foram identificados receptores para os hormônios esteróides (estrogênio e progesterona), presentes em maior quantidade nos tumores benignos em relação aos malignos. Também foi observado que há perda da expressão de receptores de estrógeno na maioria das metástases à distância. É possível que os hormônios esteróides atuem numa fase precoce da carcinogênese, perdendo o seu efeito estimulador em fases mais avançadas da doença neoplásica (NIETO *et al.*, 2000; QUEIROGA *et al.*, 2009).

O efeito ambiental está ligado a carcinogênese mamária devido à vulnerabilidade dos animais às substâncias artificiais lançadas diariamente no ambiente. Entre os principais contaminantes residuais estão os agrotóxicos, subprodutos da indústria e lixo domésticos. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2010), em mulheres 80% dos novos casos de câncer de mama estão associados à ação dos fatores ambientais. A proximidade estabelecida entre o proprietário e seu cão, determina o nível de exposição aos mesmos agentes ambientais entre ambas as espécies (RIPLEY, 2001; ANTUOFERMO, 2007; JOBIM *et al.*, 2010).

A importância desse tipo de neoplasia deve-se ao crescimento no número de animais acometidos por essa doença nas últimas décadas, além de apresentar semelhanças em diversos aspectos do câncer de mama em mulheres desperta o interesse científico no estudo comparado a partir do uso da cadela como um excelente modelo experimental em ambas as espécies (ANTUOFERMO, 2007; LAFFIN *et al.*, 2009; UVA *et al.*, 2009; KOOISTRA *et al.*, 2009).

2.4. Piretróides como contaminantes ambientais

Os praguicidas piretróides são derivados sintéticos das piretrinas I e II, ésteres naturais extraído das flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*, utilizadas como inseticidas há mais de dois séculos (SPENCER *et al.*, 2001; NASUTI, *et al.*, 2003; VIRAN *et al.*, 2003). Apesar de possuírem amplo espectro, baixo poder residual e alta eficiência em doses baixas, as piretrinas apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, diminuindo sua eficácia no controle de pragas na

agricultura e de outros insetos (CABRAS, 2003; LENG *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

A partir da década de 70 iniciou-se a utilização do uso de piretróides na agricultura, por meio de mudanças químicas estruturais induzidas nas piretrinas, obtiveram-se substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida, solucionando os problemas de instabilidade ambientais relacionados às substâncias naturais, porém, mantendo relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos (QUEIROZ *et al.*, 2001; ROCHA, 2009).

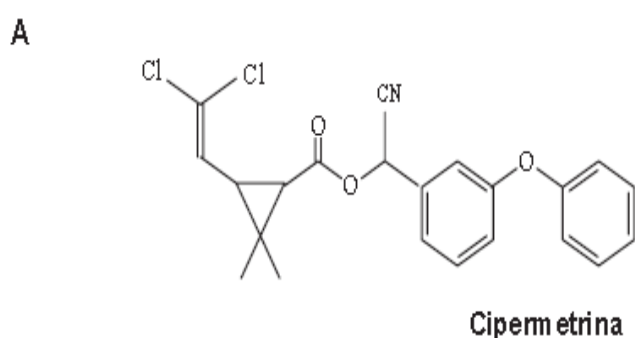
Atualmente, a utilização dos piretróides não se restringe apenas na agricultura. Os compostos deste inseticida vêm sendo aplicado em medicina veterinária no controle de ectoparasitas em pequenos e grandes animais; em campanhas de Saúde Pública na erradicação de mosquitos e no armazenamento de grãos e a domicilio para eliminação de insetos em geral. Sua formulação é disponível em aerossóis, loções, coleira e xampus. Esta praticidade na aquisição de diferentes formulações, amplo espectro de ação e uso de menores doses em relação a outros agrotóxicos consagrou este inseticida sintético como o mais usado em todo mundo (LARINI, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2001; ROCHA, 2009).

No entanto, o seu uso deve ser monitorado constantemente, pois a exposição acidental ou ingestão de resíduos nos alimentos pode trazer risco à saúde do homem e dos outros animais. Em vista disso, os piretróides podem ser utilizados como modelo para a investigação da ecotoxicologia, devido à contaminação do ar, solo e água induzindo a efeitos adversos na natureza (GRISOLIA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

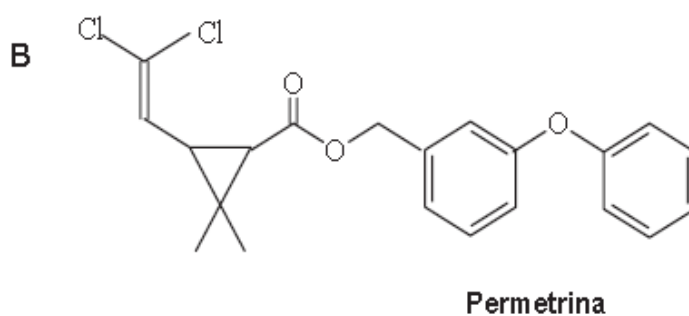
Os piretróides são constituídos por vários grupos estruturais, sendo estes basicamente compostos por um grupo ácido, um éster central e um álcool. A porção ácida possui dois carbonos quirais, permitindo com que os piretróides possam apresentar combinações estereoisomérica (Figura 2) (LARINI, 1999; ANADÓN *et al.*, 2009).

Todos os piretróides podem existir em no mínimo quatro formas estereoisoméricas, cada qual pode exercer diferentes atividades biológicas

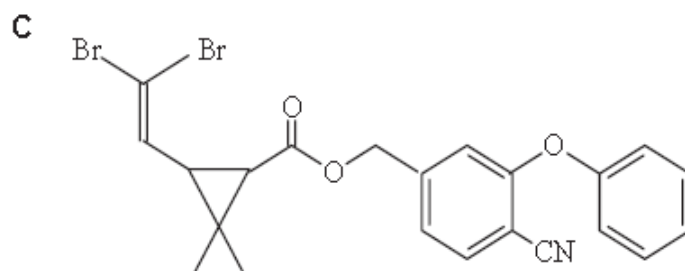
dependendo da sua estrutura química e a configuração da porção éster. A toxicidade da mistura racêmica, ou seja, 50% de levógiro e 50% de dextrógiro, pode variar de acordo a razão *cis/trans* e com as características do veículo utilizado. Os isômeros *cis* demonstram toxicidade maior e sua deposição no tecido adiposo apresenta-se em níveis mais elevados em relação ao *trans*, que se caracteriza pela baixa toxicidade em mamíferos devido a sua rápida hidrólise por esterases hepáticas (CRAWFORD *et al.*, 1981; SODERLUND *et al.*, 2002).



[(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate] - 2 isômeros

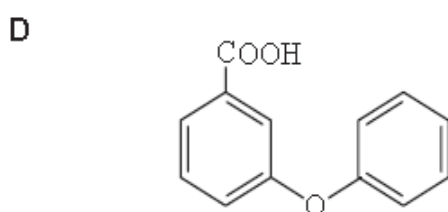


[3-fenoxibenzil (1RS, 3RS, 1RS, 3SR 1-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] – 4 isômeros.



Deltametrina

[(S)- α -ciano-3 fenoxibenzil (1R, 3R)-3-(2,2 dibromovinil)-2,2 dimetilciclopropanocarboxilato] – 1 isômero.



Ácido 3-fenoxibenzóico – metabólito da deltametrina e permetrina

FIGURA 2 – Estrutura química dos piretróides (A) cipermetrina (B) permetrina, (C) deltametrina, e (D) metabólito (Fonte: SANTOS, et al., 2007).

Assim, os piretróides sintéticos podem ser divididos de acordo com sua estrutura química em duas diferentes classes: I ou II, segundo a ausência ou presença, respectivamente, de um grupo ciano (CN) na porção α -carboxil, que determina a seletividade, tipo de ação e sítio de ataque metabólico nos diferentes organismos vivos (LARINI, 1999; SODERLUND *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007).

Os piretróides da classe I são caracterizados por provocar experimentalmente, em ratos, quadros de agressividade, tremores, espasmos, convulsões e incoordenação. Atua também nos nervos periféricos, causando em mamíferos não roedores paralisia progressiva, devido ao influxo prolongado de sódio na membrana das células nervosas. Dentre os piretróides desta classe

estão a aletrina e tetrametrina (ANADÓN *et al.*, 2006; PERRY *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010).

A adição de um CN na molécula de piretróide aumenta significamente à ação tóxica do inseticida. Os piretróides tipo II, entre eles a cipermetrina, deltametrina e cialotrina, agem preferencialmente no sistema nervoso central, induzindo em ratos sintomas de intoxicação como a hipersensibilidade a estímulos externos, salivação abundante, agitação dos membros anteriores e tremores periódicos que podem evoluir à coreoatetose. Atuam nos canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula (LATUSZYNSKA *et al.*, 2003; NASUTI, *et al.*, 2003; ANADÓN *et al.*, 2009).

Em altas concentrações, os piretróides do tipo II, podem ligar-se ao complexo receptor inotrópico do ácido γ -aminobutírico (GABA), bloqueando os canais de cloro e sua ativação, levando a uma hiperexcitabilidade do SNC. Além dos efeitos neurológicos, frequentemente são detectadas manifestações cardiovasculares após a exposição prolongada em mamíferos a estes compostos. Estes efeitos podem ser explicados pelo aumento da duração do potencial de ação induzido pelos inseticidas (LARINI, 1999; SANTOS *et al.*, 2007).

A exposição dos animais aos piretróides ocorre pela ingestão de resíduos nos alimentos, o contato dermal direto por meio da utilização de fórmulas no controle de ectoparasitas e na inalação de partículas suspensas no ar. Baseado em estudos que identificavam metabólitos de piretróides no plasma de animais expostos aos resíduos de piretróides, foi observado que a absorção dermal é pobre, alcançando apenas 2%, ao contrário da oral, que varia de 14 a 70% de absorção dos praguicidas utilizados (WOOLLEN *et al.*, 1992; SODERLUND *et al.*, 2002).

Após a exposição, os piretróides absorvidos do trato gastrointestinal, carregados pelo sangue e rapidamente distribuídos por todos os tecidos. A metabolização destes componentes é similar em quase todos os mamíferos

(Figura 3), embora possam ocorrer variações em virtude da estrutura química do composto (SODERLUND *et al.*, 2002; McCARTHY *et al.*, 2006).

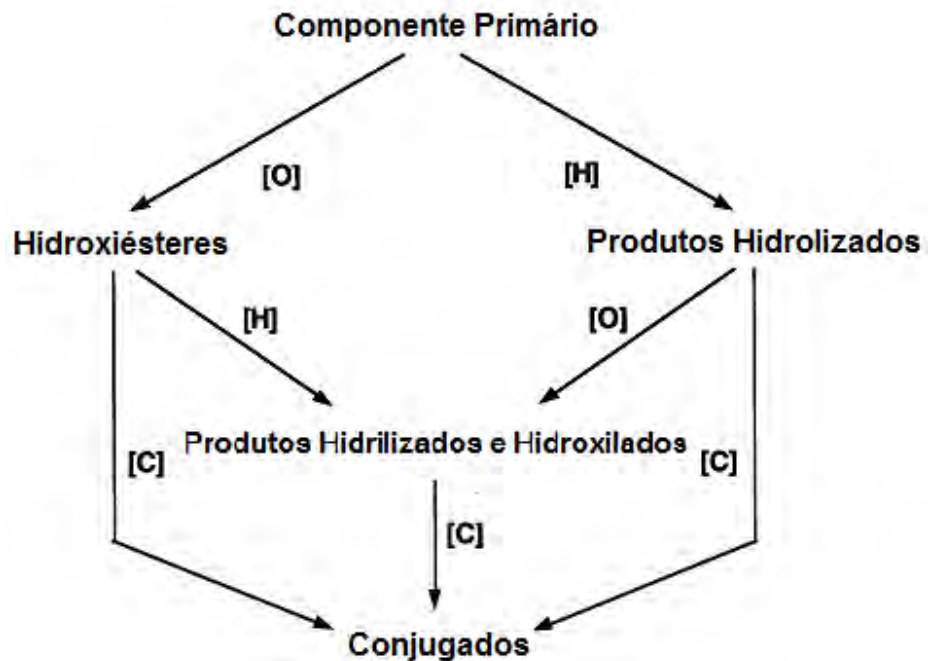


FIGURA 3. Vias de metabolização dos piretróides em mamíferos por hidrólise ([H]), oxidativo ([O]) e reações conjugadas (Fonte: SODERLUND *et al.*, 2002)

A biotransformação dos piretróides absorvidos via oral, ocorre inicialmente pela hidrólise do composto inicial no trato gastrointestinal, por meio de clivagem da ligação éster e das moléculas de álcool por intermédio de carboxiesterases, enzimas encontradas em associação com frações citocromo P450 microsossomais de homogenatos de tecidos disponíveis no fígado, cérebro, rins e sangue. A clivagem da ligação éster acontece em maior extensão em moléculas *trans* do que na forma *cis* (SODERLUND *et al.*, 2002; ANADÓN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010).

A importância da quebra do componente inicial por hidrólise ou oxidação é relativa e depende dos isômeros que compõe a molécula do piretróide. Os metabólitos oriundos desses processos são distribuídos de modo heterogêneo e

depositados principalmente no fígado, rins, tecido adiposo, interagindo com os constituintes celulares. Nestes órgãos, os níveis de metabólitos diminuem rapidamente, com exceção ao tecido adiposo devido a características lipofílicas dos metabólitos. A metabolização resulta na formação de compostos mais polares, excretados assim pela urina conjugados em forma de substratos endógenos (taurina, glicina e PAPS) (SODERLUND *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007).

Alterações morfológicas a nível celular atribuídas às intoxicações por piretróides são relatada por alguns autores. Segundo Chauhan *et al.* (2007), a exposição à deltametrina *in vitro* e *in vivo*, pode induzir da proliferação de células mesenquimais, aberrações cromossômicas e a presença de micronúcleo. Latuszynska *et al.* (2003), verificaram leves alterações histopatológicas como o aumento densidade do citoplasma das células do córtex cerebral, neurócitos do núcleo do tálamo e das células de Purkinje no cerebelo de ratas expostas a cipermetrina associada a cloropirifós.

Em mamíferos, a toxicidade parece estar relacionada com a idade muito mais do que outros inseticidas, no entanto o número de trabalhos que relatam esse fator ainda é muito pequeno (SHAFER *et al.*, 2005; ANADÓN, *et al.*, 2009). Ratos neonatos são mais sensível aos piretróides tipo II, devido à baixa capacidade metabólica, em relação aos adultos (LAURINI, 1999). Em um estudo utilizando doses agudas de deltametrina, observou-se que a letalidade foi 16 vezes maior em neonatos em relação a adultos (SHEETS *et al.*, 2004).

A sensibilidade aos piretróides em diferentes idades pode ser influenciada pela dose, embora o efeito de doses baixas em períodos prolongados seja pouco estudado, esse parâmetro é evidenciado em doses agudas (SHEETS *et al.*, 2004; SHAFER *et al.*, 2005; ANADÓN *et al.*, 2009).

Atualmente, uma das maiores preocupações em relação à exposição dos humanos e outros animais aos contaminantes ambientais são se os resíduos dessas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais são as substâncias que estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas

substâncias químicas podem ser consideradas como seguras; se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias e se esses ensaios podem ser facilmente usados em larga escala para monitorar seus efeitos no meio ambiente (BILA e DEZOTTI, 2007).

2.5 Possíveis atuações dos piretróides no carcinoma espontâneo de mama.

Apesar de serem os praguicidas sintéticos mais utilizados em todo mundo, ainda muito pouco foi feito para avaliar os efeitos causados pela exposição prolongada de resíduos dos piretróides na vida do homem e dos outros animais. De acordo com o “International Programme on Chemical Safety” (IPCS) (WHO, 2004), os piretróides cipermetrina, deltametrina e lambda- cialotrina são classificados como moderadamente tóxicos. Apesar da baixa toxicidade verificada para mamíferos, estudos toxicológicos recentes mostraram que os piretróides estão entre os praguicidas mais tóxicos para organismos aquáticos, como peixes e crustáceos (PINHO *et al.*,2009).

Piretróides como a cipermetrina e a deltametrina, são classificada pela Agencia Internacional do Câncer (IARC), nível 03 de periculosidade, ou seja, não conclusivo carcinogênicos para o homem e a Organização Mundial da Saúde define a deltametrina como inseticida moderadamente perigoso (IARC, 2008; EPA, 2008, WHO,2008).

Segundo a Environmental Protection Agency (1997), responsável pela regulamentação e fiscalização de substâncias químicas nos Estados Unidos, os piretróides são classificados como: “potencial desregulador endócrino”. Embora os mecanismos pelos quais os piretróides atuem no sistema endócrino não estão bem estabelecidos, diversos trabalhos científicos vêm descrevendo a ação destes como precursores de doenças consideradas hormônio dependentes do sistema

endócrino podendo atuar até como um iniciador ou promotor de neoplasias (GAREY e WOLFF, 1998; ANADÓN *et al.*, 2009).

De acordo com Chen *et al.* (2002) e Zhao *et al.* (2008), os piretróides: deltametrina, cipermetrina, I – cialotrina e permetrina, podem induzir a proliferação de células da linhagem MCF-7 de carcinoma espontâneo de mama em mulheres. Para Vá *et al.* (1999); Chen *et al.*, 2002 e Zhao *et al.* (2008), a I-cialotrina, aumenta a expressão do gene pS2, induzível por estradiol (E2) nas células MCF-7 e a deltametrina compete na ligação de receptores de estrógeno (ER).

Os metabolitos dos piretróides podem apresentar características de xenoestrógeno, ou seja, substância esta que mimetiza a ação do hormônio sexual feminino (FANG *et al.*, 2001). Isto ocorre devido à relação a sua atividade – estrutural da molécula que pode se recombinar expressando características estrogênicas em humano (McCARTHY *et al.*, 2006).

Para alguns autores a cipermetrina, tetrametrina e aletrina tem mostrado induzir o estresse oxidativo e gerar ERO em experimentos com ratos (KALE *et al.*, 1999; GIRAY *et al.*, 2001). O estresse oxidativo e a produção de ERO podem causar danos no DNA, atuando assim, como um carcinógeno químico, responsável pelo crescimento descontrolado principalmente de células mesenquimais (ZEGURA *et al.*, 2004).

Porém não são todos os estudos que demonstram que os piretróides e seus metabólitos possuam atividade de estrogênica (SAITO *et al.*, 2000; KUNIMATSU *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004). Quanto à carcinogenicidade poucos relatos são encontrados na literatura especializada no assunto, porém assim como outras substâncias químicas de atuação estabelecida, a ocorrência desses efeitos está na dependência da estrutura molecular, da dose e da intensidade de exposição (GARRIDO *et al.*, 2005). Não há na literatura atual, trabalhos que relatem algum efeito dos piretróides em tumores de mama em cadelas.

2.6 Determinações dos piretróides por HPLC

A determinação de resíduos de piretróides pode ser realizada por meio de técnicas cromatográficas, devido à facilidade de separação, identificação e quantificação das substâncias presentes na amostra, com a utilização de detectores e padrões específicos (GALLI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007). Dentre elas destacam-se a cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de captura de elétrons ou acoplada ao detector de massas no modo de seleção de íons e a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*- HPLC) acoplada a detector ultravioleta (VIEIRA, *et al.*, 2007).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência passou a ser uma das técnicas analíticas mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina.

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência se desenvolve pela passagem de uma mistura através de duas fases: uma estacionária (fixa) e outra móvel à alta pressão. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas, sendo assim utilizada na determinação de resíduos em diferentes amostras biológicas, como em sangue e tecido de animais experimentais (DING *et al.*, 2004; ANADÓN *et al.*, 2006; ANDRADE, 2008) e em alimentos como frutas, vegetais e leite (BISSACOT e VASSILIEFF, 1997). Além disso, a HPLC permite a determinação de compostos não voláteis e termolábeis, como acontece no emprego da Cromatografia Gasosa (CHEN e WANG, 1996; ZENEON e PASCUET, 2005).

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Qualificar e quantificar os inseticidas piretróides aletrina, lambda- cialotrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina no tecido adiposo adjacente a mama de cadelas com e sem carcinomas espontâneos.

3.2 Específicos

Investigar a ocorrência dos níveis de cada piretróide encontrado e correlacionar com a expressão morfológica e o grau de agressividade dos tumores descritos por meio do exame histopatológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aquisição dos Animais

Este estudo obedeceu às normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal –CEEA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia mantida pela Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu), parecer favorável nº 99/2008, que incluiu a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido dos proprietários ou responsáveis pelos animais.

4.2 Procedimento

Foram adquiridas 60 cadelas, sem predileção por raça, com idade entre cinco e 15 anos, distribuídas ao acaso em dois grupos. O Grupo 1 (G1) foi formado por 30 cadelas com diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma espontâneos de mama atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Botucatu e no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça (FAMED), mantida pela Associação Cultural e Educacional de Garça (ACEG). O Grupo 2 (G2) por 30 cadelas com diagnóstico clínico negativo para neoplasia de mama, encaminhadas para o exame necroscópico no Serviço de Patologia da FMVZ, UNESP, Botucatu e no Laboratório de Patologia Veterinária FAMED, ACEG, Garça.

Os critérios de inclusão dos animais nos grupos 1 e 2 foram: que não houvesse histórico clínico de distúrbios hormonais ou pseudociese e que possuísse acima de cinco anos de idade (Anexo 1).

4.3 Análise da condição corporal

Para avaliação da massa corporal e determinação do estado físico (Figura 4) foi utilizado os critérios descritos por HILL'S (1999), que classifica o animal em:

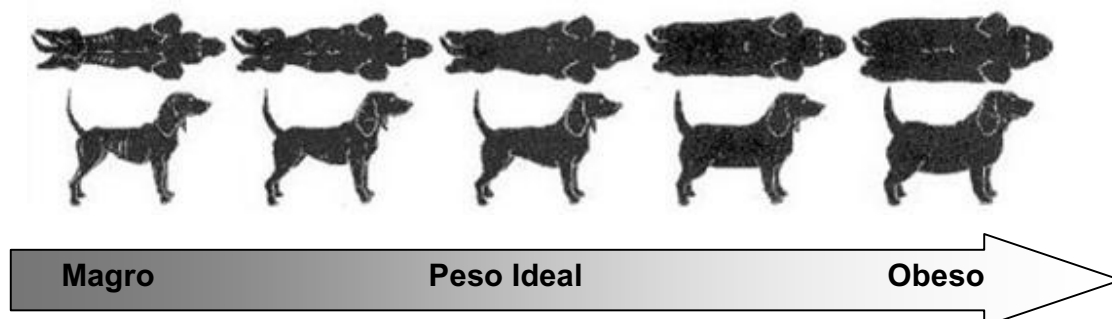


FIGURA 4 – Caracterização da composição corporal estabelecido pela Hill's (1999).

MAGRO – Costelas facilmente palpáveis, sem cobertura de gordura. Base da cauda com ossos proeminentes, com o mínimo ou sem gordura entre a pele e os ossos. Visão lateral, curvatura abdominal acentuada ou marcante. Visão dorsal, silhueta da cintura bastante acentuada ou marcante.

PESO IDEAL – Costelas facilmente palpáveis, com pouca cobertura de gordura. Base da cauda com contorno suave, ossos palpáveis com fina camada de gordura. Visão lateral, curvatura abdominal e visão dorsal com silhueta da cintura proporcional.

OBESO - Costelas dificilmente palpáveis, com moderada ou abaixo de espessa cobertura de gordura. Base da cauda ligeiramente abaulada ou abaulada e difícil de palpar, abaixo de moderada ou espessa camada de gordura. Visão lateral, a gordura sobressai do abdômen e não há curvatura abdominal ou cintura.

4.4 Coleta e processamento de material

- *Exame Citopatológico*

Após exame clínico completo dos animais do G1 e registro dos dados, foi realizado o exame citopatológico para caracterizar preliminarmente o aumento de volume como neoplasia de origem mamária.

Para o exame citopatológico foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis de 13 x 4,5 mm para punção de nódulos mamários menores que

1,0 cm e 30 x 7 e 30 x 8 mm para nódulos cujo diâmetro ultrapasse 1,0 cm; seringas hipodérmicas descartáveis de 10 ml. O material obtido da citopunção foi distendido em lâminas histológicas. Parte das lâminas foram fixadas com metanol p.a. (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e etanol 95% (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e corado pelas técnicas de May-Grünwald Giemsa e Papanicolaou, respectivamente. As amostras foram examinadas ao microscópio de luz (ZEISS – Modelo AXIO Imager A1)

- *Procedimento Cirúrgico*

Os animais com diagnóstico citopatológico positivos para neoplasia mamária (G1) foram submetidos à mastectomia parcial ou radical. As peças cirúrgicas foram encaminhadas ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu para análise anatomopatológica e processamento deste material para exame histopatológico e de HPLC.

- *Necropsia*

As cadelas encaminhadas ao Serviço de Patologia Veterinária FMVZ/UNESP-Botucatu e Laboratório de Patologia Veterinária FAMED/ACEG, que macroscopicamente não apresentavam neoplasias de mama, foram necropsiadas imediatamente ou até 8 horas após a morte, sendo estas acondicionadas em câmara fria a 4° C até o momento do exame, executado como de rotina. A mama foi retirada, devidamente identificada e processada para exame histopatológico e o tecido adiposo adjacentes à mama foi processado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC.

- *Exame Histopatológico*

As amostras oriundas do G1 e G2, antes de serem processadas foram retiradas cinco gramas de tecido adiposo adjacente ao tecido mamário, neoplásico ou não e acondicionados em frascos estéreis e congelados.

Fragmentos das mamas foram fixados em formalina tamponada a 10%, rotineiramente processados e corados com Hematoxilina e Eosina. 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 (MISDORP *et al.*, 1999).

- *Exame Toxicológico*

Os cinco gramas de tecido adiposo adjacente às mamas de ambos os grupos, G1 e G2, permaneceram congelados a temperatura de - 4° C até o processamento e análise feita pela técnica quantitativa de HPLC, segundo o método de BISSACOT e VASSILIEFF (1997) modificado (ANDRADE, 2008), que consistiu nas etapas de extração e purificação, descritas abaixo:

Extração:

- Adicionou-se 5 ml/g de amostra em um elenmeyer. Posteriormente 10 gotas de HCL 1,0N. A amostra ficou com pH em torno de 4,0
- Adicionou-se 40 ml de Acetonitrila, grau HPLC e agitou-se em agitador orbital durante 30 minutos.
- Filtrou-se em papel filtro quantitativo coletando o filtrado em um béquer.

Purificação:

- Colocou-se 4 g de sílica gel em coluna cromatográfica. Posteriormente n-hexano de modo que ficasse totalmente umidecida.
- Ressuspendeu-se o resíduo com 10,0 ml de n-hexano, eluindo pela coluna. O eluato foi coletado em um béquer
- Adicionou-se à coluna 10,0 ml de n-hexano: éter etílico (9:10), coletando no mesmo béquer.
- Levou-se o eluato à secura em capela de exaustão.

O resíduo seco foi ressuspenso com 1,0 ml de Acetonitrila e injetado no Cromatógrafo.

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, separando-se em n-hexano e purificado em coluna de sílica-gel com n-hexano e éter dietílico. Foram utilizados os padrões específicos CLP-023R-160X: Individual Pesticides Standard (Accu Standard Inc - Miller-Stephenson Chemical Co.). Para análise foi utilizado o cromatógrafo, modelo CG 480C do CEATOX, 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 .

4.5 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos (Grupo Controle - G1; Grupo com Carcinoma - G2) e trinta repetições para os cinco piretróides avaliados separadamente ($P < 0,05$).

Para verificar se houve dependência entre a presença dos piretróides e os grupos avaliados foi realizado o Teste Qui-Quadrado ($P < 0,05$).

A análise dos gráficos demonstrou que a maior parte da distribuição foi assimétrica, e portanto realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparar a diferença dos dois grupos ($P < 0,05$). Os programas utilizados foram *Sigma Stat* versão 3.1 e *BioEstat* 5.0.

5. Resultados

5.1 Frequência de raças e idade

No período de maio de 2005 a novembro de 2009 foram estudados 60 fragmentos de mama e o tecido adiposo adjacente a mesma. Destas, 26 amostras foram provenientes de procedimento cirúrgico e 34 de animais submetidos ao exame necroscópico. Dos animais estudados, 15 viviam em ambiente rural e 45 urbano.

No G1, composto por 30 animais que apresentam carcinoma espontâneo de mama, houve o predomínio de cadelas sem raça definida (12/30); seguidas pela raça Boxer (3/30), Poodle (3/30), Pastor Alemão (3/30), Labrador (2/30), Pincher (2/30), Cocker Spaniel (1/30), Dachshund (1/30), Pastor Belga (1/30), Beagle (1/30) e Rottweiler (1/30). A média de idade dos animais acometidos foi de 9,7 anos, com uma amplitude de cinco a 13 anos. A maior incidência desta neoplasia ocorreu em cadelas de doze anos (23,3%); depois por animais com oito e nove anos (16,6%); dez anos (13,3%); sete e treze anos (10%) e cinco, seis e onze anos (3,3%). A distribuição da frequência de neoplasias de mama idade está apresentada na Figura 5.

O G2, animais que não possuíam diagnóstico para carcinoma espontâneo de mama, foi composto, na sua maioria, por cadelas SRD (21/30), depois por animais da raça Fox Paulistinha (3/30), Pit Bull (2/30), Boxer (1/30), Weimaraner (1/30), Pastor Alemão (1/30) e Rottweiler (1/30). A idade dos animais deste grupo variou entre cinco e 15 anos, sendo a média de 8,1, representada da seguinte forma: quatro animais (13,3%) possuíam cinco, seis ou sete anos; sete (23,3%) tinham oito anos; cinco cadelas (16,6%), dez anos e apenas uma (3,3%) doze, treze e quinze anos (Figura 6).

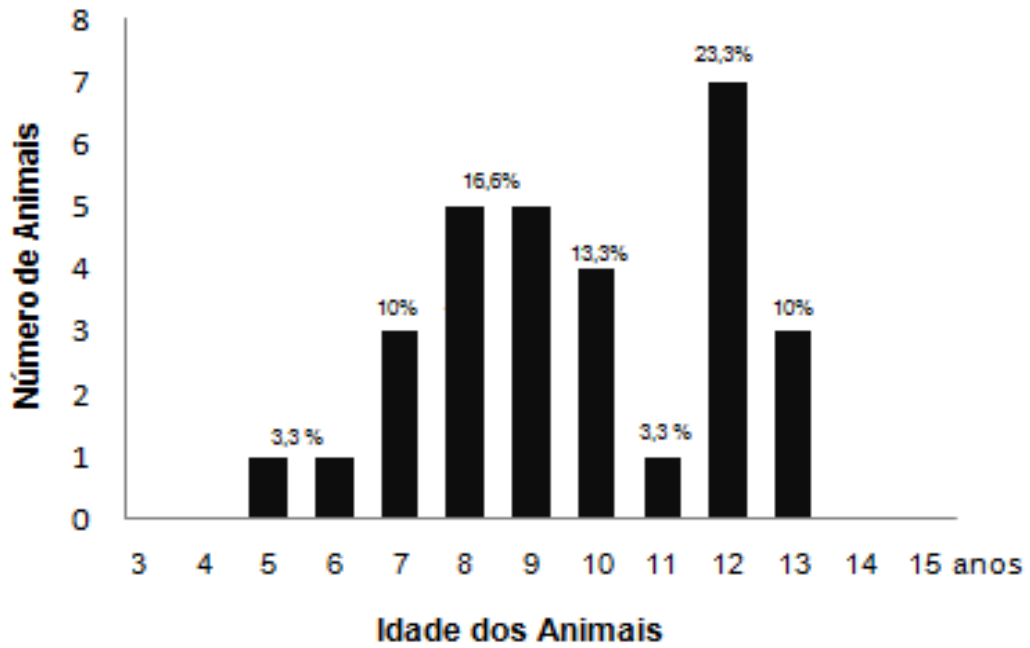


FIGURA 5: Distribuição dos animais do Grupo 1, com carcinomas mamários, segundo a frequência de idades.

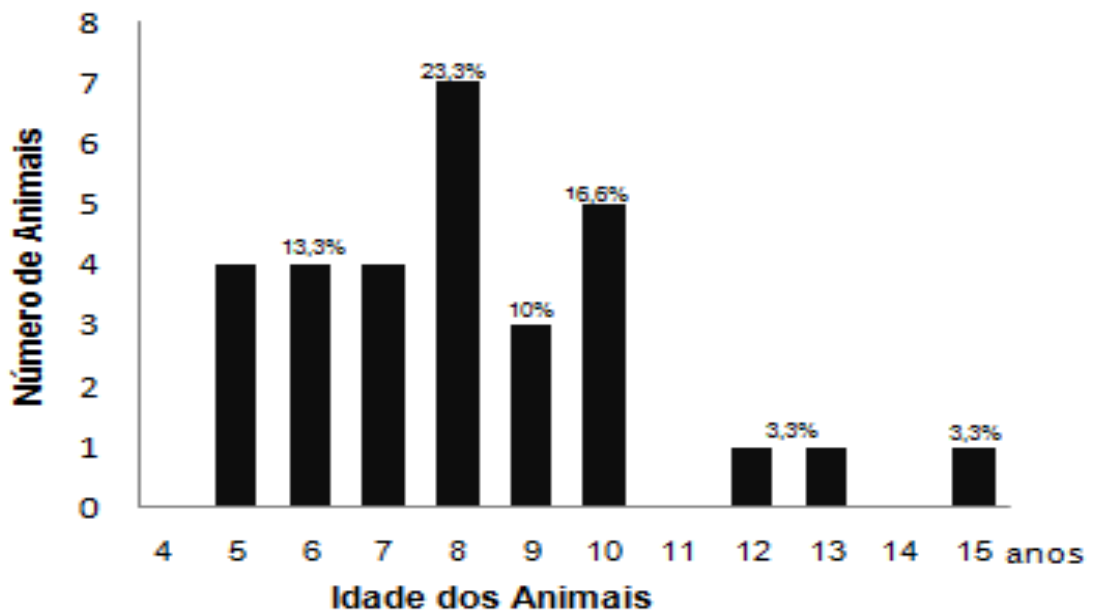


FIGURA 6. Distribuição dos animais do Grupo 2, sem carcinomas mamários, segundo a frequência de idades.

5.2 Análise da condição corporal e o resíduo na gordura

O peso corpóreo dos animais no G1 esteve entre 3,3 a 40 kg. Segundo a classificação de Hill's (1999), oito animais eram obesos (26,7%); 21 regulares (70%) e apenas um foi classificado como magro (3,3%). Nos animais do G2, o peso variou de 3,0 a 58,0 kg. Destas, cinco cadelas eram obesas (16%); 18 regulares (60%) e sete magras (23%).

Dos animais estudados de ambos os grupos, 36 cadelas (60%) apresentavam níveis de piretróides em seu tecido adiposo adjacente a mama. A disposição destes animais segundo sua raça, massa corporal e ambiente onde viviam está disposta na Tabela 1.

Quando comparado o nível de resíduos dos piretróides com a massa corporal dos animais dos dois grupos, não houve diferença significativa ou influencia do grupo na quantidade de resíduos (Figura 7).

TABELA 1 – Animais dos grupos 1 e 2 que apresentavam níveis de piretróides tecido adiposo adjacente a mama dividida em relação massa corpórea e ambiente rural e urbano.

GRUPOS	ANIMAIS		MASSA CORPÓREA ^c			AMBIENTE	
	RAÇAS	NO.	MAGRO	REGULAR	OBESA	RURAL	URBANO
G1 ^a (n=17)	RAÇAS PURAS	09/17	01/ 5,8%	04/23,5%	03/17,6%	01/5,8%	8/47%
	SRD	08/17	--	02/11,7%	06/35,2%	01/5,8%	7/41,2%
G2 ^b (n=19)	RAÇAS PURAS	5/19	01/5,2%	04/21,5%	--	02/10,5%	03/15,8%
	SRD	11/19	04/21,5%	10/52,6%	---	05/26,3%	09/47,4%

Grupos dos animais estudados: ^A Cadelas que apresentavam carcinoma espontâneo em mama; ^B Cadelas que não tinham diagnóstico positivo para carcinoma espontâneo de mama. ^C Classificação segundo HILL'S (1999).

Observa-se a maior frequência de níveis de resíduos, assim maiores picos em animais regulares, seguidos por magros e depois obesos de ambos os grupos (Tabela 2).

TABELA 2– Comparação entre os níveis de resíduos de piretróides detectados e quantificados no tecido adiposo adjacente a mama das cadelas dos grupos 1 e 2.

CARCINOMA DE MAMA (G1)									CONTROLE (G2)							
M. C. ^a	AMBIENTE			PIRETRÓIDES (µg)*					AMBIENTE				PIRETRÓIDES (µg)*			
	Nº.	R.	Urb	Alet	Delt	Cirp	L- cial	Tet	Nº	R.	Urb	Alet	Delt	Cirp	L- cial	Tet
Mag.	01	--	01	--	0,04	--	0,01	--	05	03	02	--	0,2	0,05	0,82	1,86
Reg.	10	01	09	0,04	0,13	0,81	0,18	--	14	04	10	1,89	0,06	0,06	0,98	0,54
Ob.	06	--	06	0,03	0,11	0,02	0,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--

* Média dos níveis dos piretróides : aletrina (Alet); deltametrina (Delt.); cipermetrina (Cirp.); l-cialotrina (L-cial.) e tetrametrina (tet.). ^a Classificação segundo HILL'S (1999).

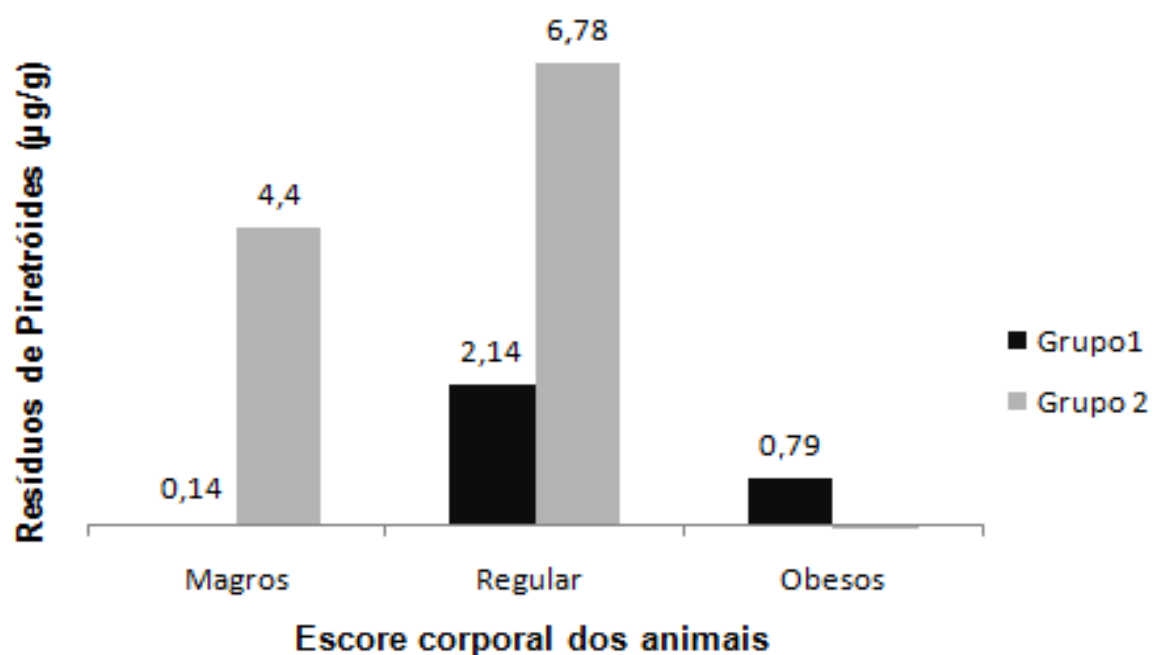


FIGURA 7. Comparação entre os níveis de resíduos de piretróides encontrado no tecido adiposo adjacente a mama e a massa corporal das cadelas do grupo 1 e 2.

5.3 Distribuição anatômica e análise morfológica

Os animais do G2 não expressaram características morfológicas que pudessem ser classificadas como neoplásicas, no entanto foram observados padrões histológicos distintos em cada cadela, constituídos por diferentes proporções de parênquima e estroma mamário (Figura 9 e 10). Não obstante, diferentes níveis de resíduos de piretróides foram quali-quantificados no tecido adiposo adjacente a mama dos animais deste grupo.

O exame citopatológico foi importante durante a triagem dos animais que apresentavam tumores em região da mama, auxiliando no diagnóstico rápido durante o exame clínico. A abundância celular e o padrão morfológico dos carcinomas mamários tornaram possível a identificação e seleção destas neoplasias (Figura 11 e 13).

Em seguida, o diagnóstico citopatológico foi confirmado pelo histopatológico que classificou as neoplasias em: carcinoma complexo (56,6%) (Figuras 12); simples (43,4%) (Figura 14) com suas variantes: cístico; cribriforme; papilífero; túbulo-papilífero e sólido. A distribuição das neoplasias está disposta na Figura 8.

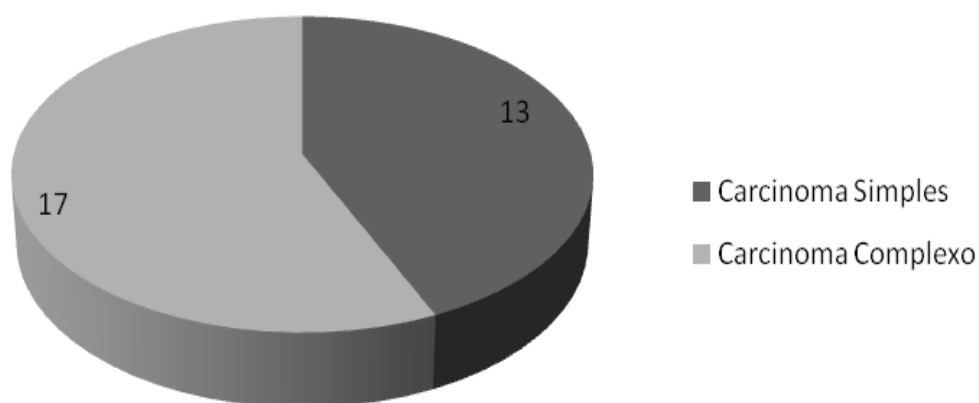


FIGURA 8 - Distribuição dos carcinoma de mama avaliados (n=30) conforme o tipo histológico, segundo a classificação da OMS (MISDORP, 1999).

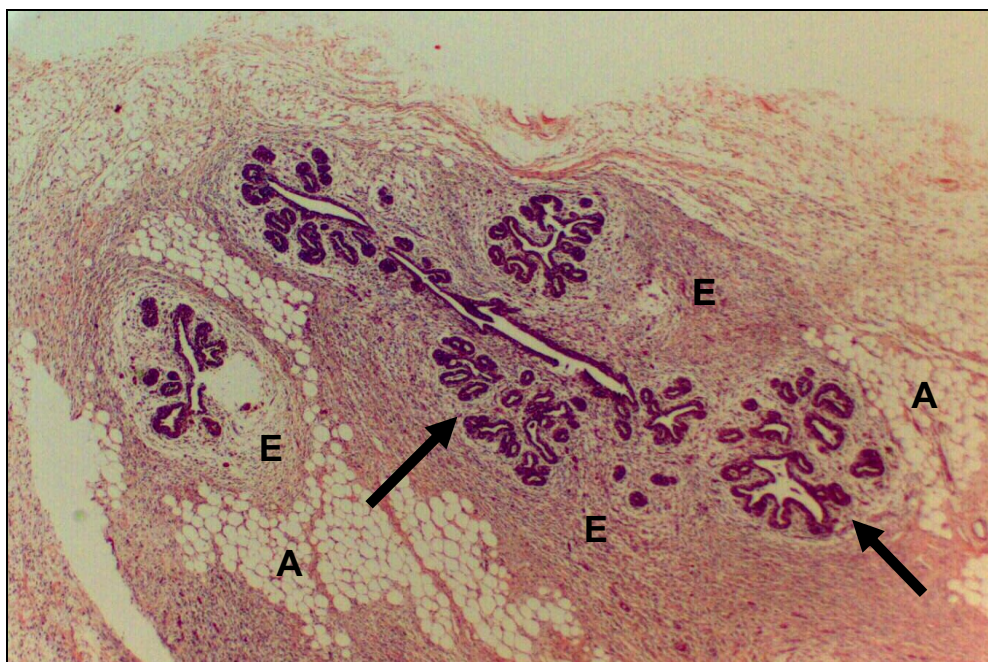


FIGURA 9 – Exame histológico: densa camada de estroma (E), que envolve o parênquima mamário (seta) e tecido adiposo adjacente (A) . Cadela de 10 anos, sem resíduos de piretróides detectados. H.E. 2,5X.

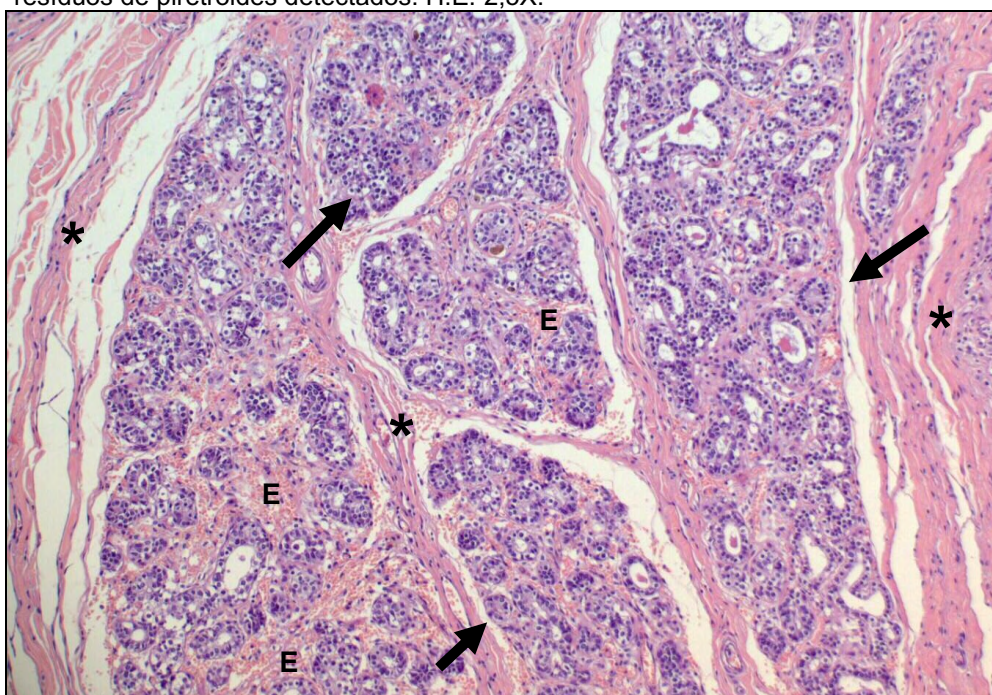


FIGURA 10 – Exame histológico: parênquima mamário produtivo com diversos ácinos (seta), pouco estroma (E) e tecido conjuntivo denso (asterisco). Cadela de 13 anos, detectado 1,89 $\mu\mu$ /g de aletrina; 0,07 $\mu\mu$ /g de cipermetrina e 0,12 $\mu\mu$ /g de deltametrina no tecido adiposo adjacente ao tecido mamário . H.E. 2,5X.

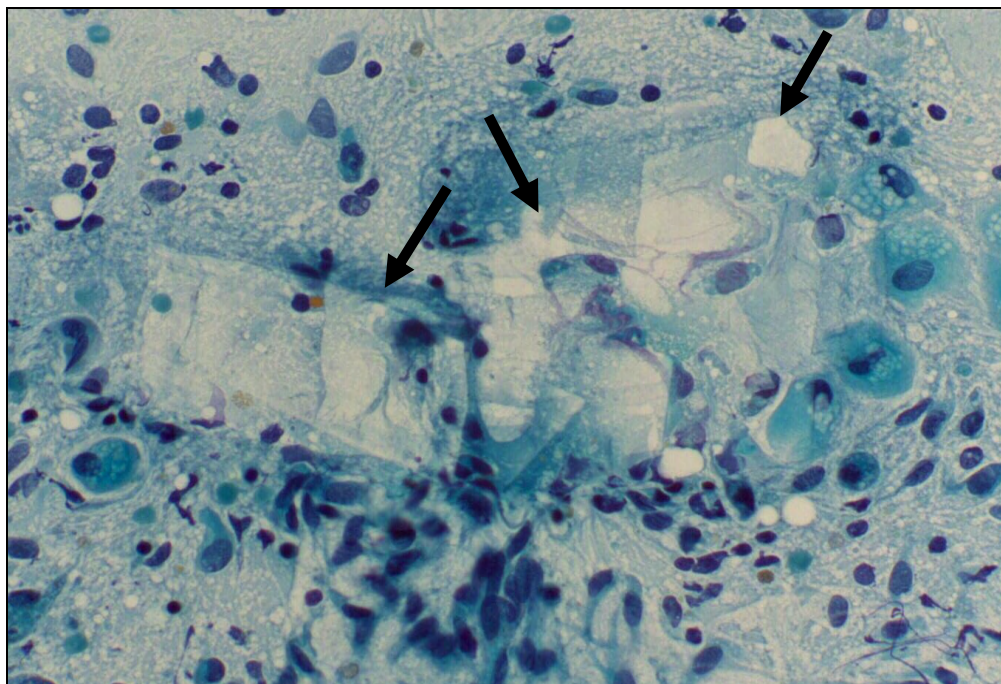


FIGURA 11- Exame citopatológico: carcinoma simples de mama de cadela, denota-se a presença de cristais de colesterol (seta) , entre células epiteliais neoplasicas. Papanicilau, 40X.

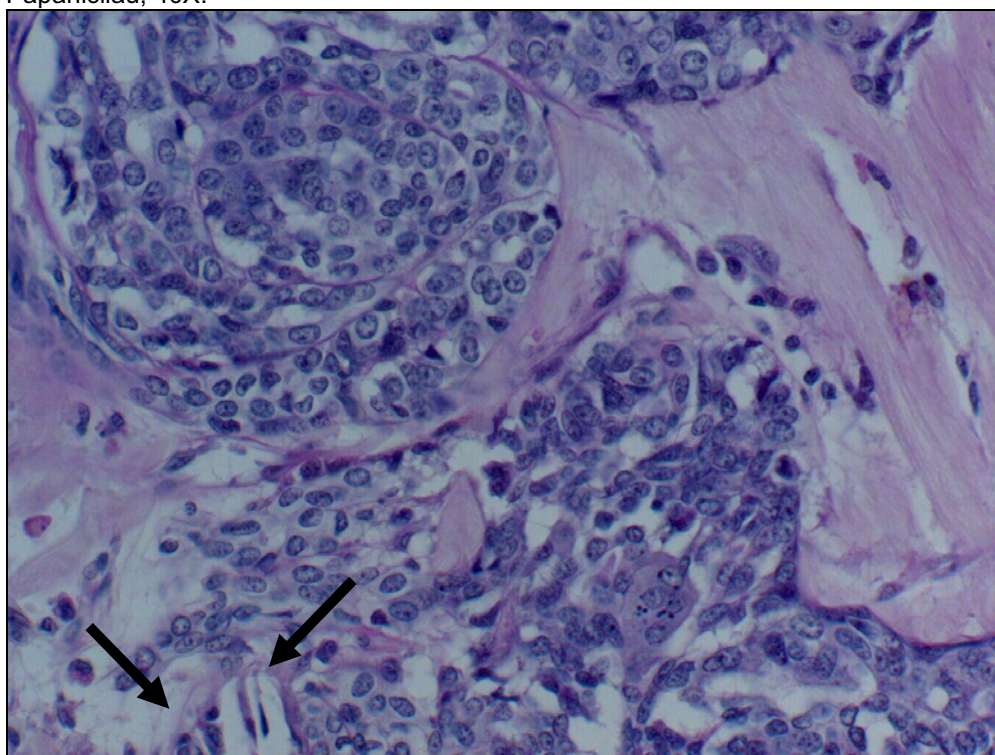


FIGURA 12- Exame histopatológico: carcinoma simples de mama de cadela, denota-se a presença de cristais de colesterol (seta), entre células epiteliais neoplasicas formando arranjos alveolares.H.E., 40X.

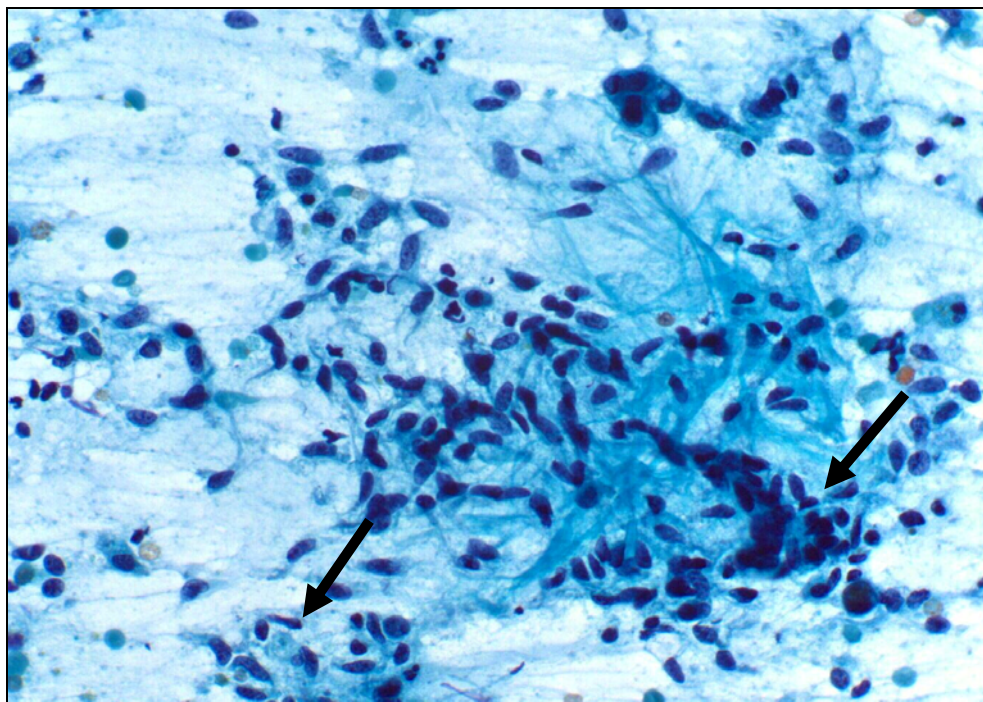


FIGURA 13 - Exame citopatológico: carcinoma complexo de mama em cadela; componentes celulares epiteliais e mesenquimais, presença de células fusiformes que lembram mioepiteliais (seta). Papanicolau, 20X.

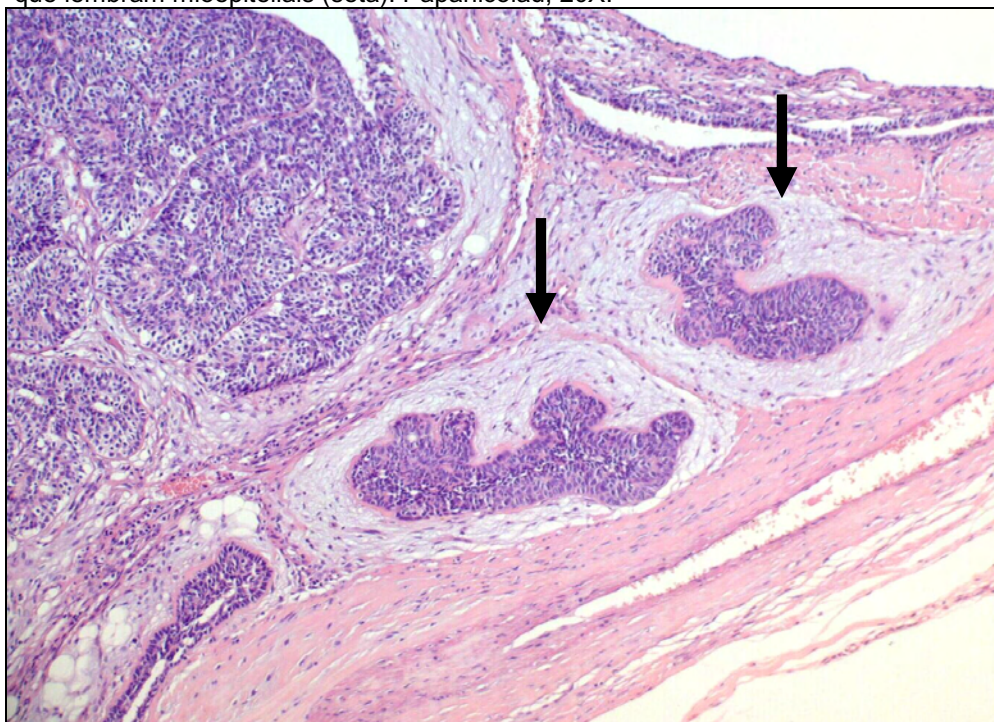


FIGURA 14 - Exame histopatológico: carcinoma complexo de mama em cadela; proliferação acinar de células epitelial neoplásica, circunscrito por tecido mixóide amorfo (seta). H.E, 20X.

Posteriormente, os carcinomas foram classificados segundo seu de malignidade em grau I, II e III (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação histológica de carcinomas e graduação conforme o grau de malignidade.

Classificação histológica	n	Grau I	Grau II	Grau III
Carcinoma Simples	13	4 (13,3%)	4 (13,3%)	5 (16,7%)
Carcinoma Complexo	17	1 (3,3%)	7 (23,3%)	9 (30%)
X²=3,867		P=0,1447		

Não houve diferença ($p>0,05$) entre os graus pelo teste do Qui-Quadrado.

A não houve diferença significativa quanto ao grau de malignidade dos diferentes carcinomas e os níveis de piretróides encontrado no tecido adiposo adjacente ao tumor.

Os carcinomas apresentaram-se localizados em uma ou múltiplas mamas. Quando as massas eram localizadas em apenas uma região (28/30), as mamas mais afetadas foram às abdominais (50%), seguidas pelas mamas inguinais (23,3%) e torácicas (20%). Quando as massas eram múltiplas (02/30), foi observado predomínio de lesões na região abdominal esquerda (3,3%) e por toda extensão da mama do lado direito (3,3%) (Tabela 4).

TABELA 4 – Comparação entre frequência da localização do carcinoma na mama e a massa corporal dos animais do grupo 1.

Mama acometida	Escore Corporal		
	Magro	Obesa	Regular
Abdominal Cranial D.	0	2	5
Abdominal Cranial E.	0	0	3
Abdominal Caudal D.	0	1	1
Abdominal Caudal E.	0	2	2
Inguinal D.	1	0	3
Inguinal E.	0	2	1
Multiplos em toda cadeia D.	0	0	1
Torácica Abdominal E.	0	0	1
Torácica Caudal D.	0	0	1
Torácica Caudal E.	0	0	1
Torácica Cranial D.	0	0	1
Torácica Caudal	0	1	1
X²=15,221	P=0,8526		

Não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos pelo teste do Qui-Quadrado. A mama acometida independe do escore corporal.

Ao relacionar localização da neoplasia com o escore corporal dos animais no G1, não verificou-se nenhuma correlação estatística.

Quanto a comparação dos níveis de piretróides entre os grupos, não houve diferença da frequência dos níveis de piretróides entre os Grupo 1, com carcinoma de mama, e o Grupo 2, considerado o grupo controle, onde os animais não possuíam diagnóstico para carcinoma espontâneo de mama, como demonstra a Tabela 4.

TABELA 5 – Comparação entre os grupos G1 e G2 da frequências de animais que apresentavam resíduo de piretróide no tecido adiposo adjacente a mama.

Grupo	Piretróide									
	Aletrina		Deltametrina		Cialotrina		Tetrametrina		Cipermetrina	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
1	25	5	19	11	24	6	29	1	24	6
2	29	1	15	15	26	4	26	4	25	5
P	0,1967		0,4345		0,7290		0,3502		0,7386	

A presença ou ausência do piretróide independe do grupo, para todos os piretróides estudados ($P > 0,05$).

Os dois grupos foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$), uma vez que os dados não apresentaram normalidade (Tabela 5), todavia não observou-se relação direta entre a presença de resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente a mama e o desenvolvimento, ou não de carcinoma.

TABELA 6- Análise da mediana para cada piretróide identificado nos grupos.

GRUPOS	Deltametrina	Aletrina	Cipermetrina	Cialotrina	Tetrametrina
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
P	0,287	0,105	0,913	0,608	0,161

Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos avaliados ($P > 0,05$)

Embora a relação entre os níveis de piretróides e a expressão morfológica dos carcinomas no G1 não tenha sido significante (Tabela 7), observa-se a maior incidência de carcinoma complexo em cadelas que apresentavam maiores níveis de piretróides no tecido adiposo adjacente a massa tumoral.

TABELA 7 – Comparação entre os níveis de piretróides nos carcinomas diagnosticado no Grupo1.

Neoplasias	Presença de Resíduos de Piretróides		
	Sim	Não	N
Carcinoma Simples	5	8	13
Carcinoma Complexo	11	6	17

X²=2,038 **P=0,533**

Não houve diferença ($p < 0,05$) entre as neoplasias pelo teste do Qui-Quadrado, ou seja os carcinomas independem da presença ou não de resíduos de piretróides.

6. Discussão

Os praguicidas sintéticos piretróides, vêm sendo amplamente utilizados em medicina veterinária, agricultura e em produtos domissanitários. A presença de seus resíduos no meio ambiente expõe organismos não alvos aos efeitos tóxicos dos mesmos. A metabolização e excreção destes resíduos ocorrem de forma rápida em mamíferos, embora parte deles possa ser depositado no tecido adiposo (LARINI, 1999; ANADÓN *et al.*, 2006; CROW *et al.*, 2007; GODIN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010).

Esse trabalho identificou e quantificou os níveis de aletrina, cipermetrina, deltametrina, tetrametrina e l-cialotrina no tecido adiposo adjacente a mama de cadelas pela técnica de HPLC, obedecendo ao mesmo método utilizado por ANDRADE (2008). A análise demonstrou sensibilidade na determinação quantitativa e qualitativa dos resíduos, comprovando a sua eficiência e adaptabilidade na análise de diferentes substâncias como já descrito por outros autores (BISSACOT e VASSILIEFF, 1997; ANDRADE, 2008).

As cadelas, de ambos os grupos, foram classificadas em magras, regulares e obesas, segundo a análise da massa corporal proposta por Hill'S (1999), onde os animais são caracterizados, basicamente, pela quantidade de gordura disposta ao longo do tórax e abdômen, tendo como referencial a visualização dos ossos da costela.

A análise do tecido adiposo adjacente a mama, no presente estudo, demonstrou que os animais apresentaram níveis variados de resíduos de piretróides independente a classificação da massa corporal. A Figura 6 demonstra que os maiores índices de piretróides foram detectados nos animais considerados regulares, seguidos pelos magros e depois os obesos. Ainda que o número de animais estudados seja pequeno, a quantificação destes piretróides, pode demonstrar que a distribuição de seus resíduos ocorre de forma não homogênea nos diferentes tecidos, como relata CRAWFORD *et al.* (1981); VIRAN *et al.* (2003) e ANADÓN, *et al.* (2006).

A maior frequência de resíduos encontrada em animais magros em relação aos obesos pode estar interligada com a característica lipofílica dos metabólitos de piretróides independente da quantidade de tecido adiposo. Em razão disso é possível identificar e quantificar maiores concentrações de resíduos em animais magros em relação aos animais obesos (CRAWFORD *et al.*, 1981; VIRAN *et al.*, 2003). Neste trabalho, foi observado nos animais magros, mesmo que em menor número, os resíduos se apresentam em maiores concentrações devido ao baixo volume de tecido adiposo disposto no corpo deste animal, o que não ocorre em animais obesos, muito embora essa suposição deve ser confirmada com maiores estudos.

Diversas variáveis podem influenciar a deposição dos resíduos de piretróides nos diferentes tecidos (SPENCER *et al.*, 2001; ANADÓN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2006). Fatores como contaminação ambiental (RIPLEY, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2001; DUARTE, 2002), via de exposição (GRISOLIA, 2005; ANADÓN *et al.*, 2006; BIONDO *et al.*, 2008; PARROTT, 2009), metabolização (CROW *et al.*, 2007; GODIN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2010) e idade (SHEETS *et al.*, 2004; SHAFER *et al.*, 2005).

As cadelas estudadas nesta pesquisa, não compartilhavam o mesmo ambiente, parte habitava na zona rural (25%) e a maioria na zona urbana (75%). Apesar do reduzido número de animais estudados, as cadelas provenientes da zona rural apresentaram maiores níveis de resíduos de piretróides no tecido adiposo, independente do grupo em que estavam em relação aos animais provenientes da zona urbana. Este dado demonstra a influência do meio na contaminação dos animais, apesar dos inseticidas piretróides estejam sendo amplamente utilizado tanto no meio rural quanto urbano (BRASIL, 2000; SANTOS *et al.*, 2007; EMBRAPA, 2008), denota-se que os animais da zona rural podem estar mais expostos a esses contaminantes, provavelmente devido a utilização do mesmo em grande escalas nas lavouras (LARINI, 1999; SANTOS *et al.*, 2007).

A dieta também pode estar envolvida na contaminação dos animais, uma vez que por meio desta que ocorre a principal rota de exposição às substâncias

químicas (GREENWALD *et al.*, 2001; SORENMO, 2003; BIONDO *et al.*, 2008; PARROTT, 2009). Mesmo que nem todos os proprietários ou responsáveis, conseguiram informar ao certo como era composta a dieta dos animais, sabe-se que a principal via de intoxicação é a oral (GREENWALD *et al.*, 2001; SORENMO, 2003; BIONDO *et al.*, 2008; PARROTT, 2009), e o menor índice de resíduos na gordura de animais urbanos, pode estar relacionada com a maior proximidade do proprietário e conseqüentemente, maior monitoramento da alimentação de seus animais, como também relatam Ripley (2001); Antuofermo (2007); Jobim *et al.*, (2010).

As neoplasias mamárias espontâneas são as mais comuns em cadelas, responsáveis por aproximadamente 50% de todas as afecções neoplásicas nesta espécie (MISDROP, 2002; GUIM *et al.*, 2007; LANA *et al.*, 2007), sendo que até 60% destas, são de caráter maligno (QUEIROGA e LOPES, 2002; NARDI *et al.*, 2008). A etiologia trata-se de uma interação complexa susceptível a fatores externos ou internos ao organismo, estando ambos interligados (GATANBY e FRIEDEN, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2008; INCA, 2010).

A incidência dos carcinomas espontâneo em cadela aumenta com a idade. A partir dos cinco anos, o risco dos animais desenvolverem essa doença cresce, sendo 10 anos a idade média de maior incidência (LANA, 2007; PINTO, 2009). Dos animais avaliados neste estudo com carcinoma de mama, notou-se que a média de idade das cadelas foi semelhante aos resultados citado pelos autores, acometendo principalmente cadelas de meia idade a idosas (Figura 4).

A literatura, principalmente de países europeus e norte americano, relata que há maior taxa de incidência de tumores malignos de mama em raças puras (QUEIROGA e LOPES, 2002; RUTTEMAN e KIRPENSTEINJN, 2003; LANA, *et al.*, 2007; PINTO, 2009). Entretanto, detectou-se no G1, uma maior predileção de cadelas SRD (Tabela 1) como também relata Burini, (2002); Hataka, (2004); Nardi *et al.* (2008); acompanhados de animais de raça Boxer, Pastor Alemão e Poodle. Apesar de algumas destas raças sejam citadas pelos autores (RUTTEMAN e KIRPENSTEINJN, 2003; LANA, *et al.*, 2007), é difícil estabelecer um parâmetro

para comparação, uma vez que fatores ambientais e tipo de estudo podem interferir nos resultados, fazendo com que o estudo epidemiológico, neste caso, seja variável.

Quanto à localização das neoplasias estudadas, observou-se maior predileção pelas mamas inguinais e abdominais. Os dados encontrados são similares aos descritos por outros autores (QUEIROGA e LOPES, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; HELLMÉN, 2005). A razão pela qual estas glândulas sejam mais acometidas possivelmente deve-se à maior quantidade de parênquima mamário, sofrendo assim maior resposta proliferativa devido ao efeito do estrógeno. Frente a isto, a sensibilidade e a exposição de cancerígenos químicos elevam os riscos para o desenvolvimento do câncer de mama (NARDI *et al.*, 2008).

Os exames citopatológico e o histopatológico foram utilizados nesse trabalho, respectivamente, na triagem dos animais e identificação do tipo tumoral, como descrito por Zuccari *et al.* (2001); Queiroga e Lopes (2002); Peleteiro *et al.* (2006); e na classificação morfológica e expressão dos critérios celulares de malignidade como sugerido por Misdorp, (1999); Karayannopolou *et al.* (2005); Cavalcanti e Cassali (2006).

O uso em conjunto destes exames demonstrou ser uma importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa devido ao baixo grau de invasão na coleta de amostras no citopatológico e na quantidade de informações obtidas por meio do histopatológico, como já foi descrito por outros autores (CAVALCANTI e CASSALI, 2006; RICK *et al.*, 2009). De fato, este procedimento é essencial, pois facilita a investigação do câncer de mama em cadelas, baseado no conceito “translacional” da medicina, onde se procura aproximar a ciência básica da aplicação clínica por meio da utilização de casos trazidos da rotina clínica, analisados, estudados e levados novamente para a rotina com uma nova perspectiva técnica-científica.

Os critérios histológicos usado para classificar os fragmentos de tumor mamário foi o proposto pela OMS, sendo estes, dispostos por ordem de

agressividade em: simples e complexos. As neoplasias malignas encontradas com maior incidência foi o do tipo complexo, seguido pelo simples com suas subclasses, opondo-se a frequência relatada por Burini, (2002); Oliveira, (2003); Hataka, (2004); de carcinoma simples, seguido pelo carcinoma complexo.

Os carcinomas em cadelas compartilham características similares ao câncer de mama em mulheres incluindo os mesmos aspectos histológicos, alvos moleculares, comportamento biológico, genética e respostas semelhantes para tratamentos convencionais, tornado a cadela um excelente modelo experimental, capaz de demonstrarem com maior sensibilidade a atuação do meio ambiente no desenvolvimento desta neoplasia (LAFFIN *et al.*, 2009; UVA *et al.* 2009; KOOISTRA *et al.*, 2009). A participação efetiva dos proprietários por meio do preenchimento do questionário epidemiológico e concessão de seu animal para o desenvolvimento deste trabalho demonstram que de certa forma, que a população está consciente da necessidade do estudo da comparado entre as espécies como relatou os autores.

Desta forma, o cadastro epidemiológico elaborado para o registro dos animais, buscou adquirir informações que servissem como base para o desenvolvimento deste trabalho, assim como, estabelecer parâmetros epidemiológicos entre os animais acometidos o meio ambiente onde vivem.

Das amostras de tecido adjacente a mama dos dois grupos, 60% apresentaram níveis residuais de piretróides. Destes, 31,7% foram detectados no G2, ou seja, no grupo considerado como controle. Não foi observado alterações histológica nos fragmentos de mama analisados que puderam ser relacionadas diretamente com os níveis de piretróides como descritos por Chauhan, *et al.* (2007) e Latuszynska *et al.* (2003), embora tenham estudado diferentes órgãos. No entanto maiores estudos devem ser feito para na tentativa de correlacionar as modificações a partir do tecido mamário normal, relacionando o tempo de exposição e os níveis dos resíduos dos piretróides.

No G1, 28,3% dos animais apresentaram níveis residuais de piretróides no tecido adiposo adjacente aos tumores de mama. Não houve diferença significativa

quanto à localização dos tumores no tecido mamário e a quantidade de resíduos de piretróide detectados do tecido adiposo adjacente; bem como não existiu relação na frequência de resíduos de piretróides nos diferentes graus de malignidade dos tumores, como foi citado por Andrade (2008).

Ainda que, neste estudo não houve diferença significativa no G1, verificou-se a prevalência nos carcinomas complexo em relação ao simples. Essa proliferação do componente mesenquimal no carcinoma complexo pode ter sido consequência da influencia dos resíduos de piretróides depositado nesse tecido.

A metabolização dos resíduos de piretróides, assim como outras substâncias químicas, ocorre pela ação de uma variedade de enzimas, que podem alterar a expressão de alguns genes quando atuam de forma exacerbada, tornando os metabólitos químicos eletrofílicos e ativos, permitindo com que estes liguem-se a compostos covalentes ao DNA, atuando como um carcinógeno químico indireto (IARC, 2008).

Outra maneira que os resíduos químicos dos piretróides possam estar corroborando neste processo, pode estar relacionado com o estresse oxidativo, que acontece durante o seu processo de metabolização e desintoxicação dos tecidos, ocorrendo à produção de espécie ativa de oxigênio, responsável pelo estímulo de multiplicação celular, principalmente de células mesenquimais em diferentes órgãos como o fígado, rim, mediastino e também na mama (ZEGURA *et al.*, 2004).

Como se pode observar neste trabalho, de forma geral, foram identificado e quantificados resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente a mama de cadelas, independente de terem desenvolvido o câncer de mama ou não. Apesar, não serem demonstrada diferenças significativas entre os dois grupos, não pode ser descartada a possível atuação destes resíduos no desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que sua ação não é conclusiva no processo de carcinogênese, de acordo com EPA (2004) e IARC (2005), que classifica piretróides como a cipermetrina e deltametrina no grupo 3 de periculosidade no desenvolvimento de câncer no homem.

A atuação dos piretróides como carcinógenos diretos ou indiretos, tanto quanto sua ação no organismo durante períodos prolongados de exposição não são conclusivos (SHEETS *et al.*, 2004; SHAFER *et al.*, 2005; ANADÓN *et al.*, 2009). Muito embora, estudos recentes indicam existir evidências suficientes para estudarmos com maior atenção a atuação dos resíduos destes compostos no meio e atuação do mesmo nos diferentes animais (GAREY e WOLFF, 1998; CHEN *et al.*, 2002 ; ZHAO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010).

7. Conclusões

Por meio dos resultados obtidos no desenvolvimento do presente trabalho, pode-se concluir que:

- Na análise do tecido adiposo verificou-se que há a prevalência de carcinomas complexo em relação aos demais, em animais que apresentam resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente a mama.
- O estudo dos níveis de piretróide no tecido adiposo adjacente a mama de cadela, demonstrou que o cão pode servir como um modelo biológico, na identificação e quantificação de resíduos ambientais que podem ser responsáveis por aumentar o risco do desenvolvimento de massa tumoral, inclusive no câncer de mama.

8. Perspectivas

Por meio dos dados obtidos no presente trabalho, novos estudos podem ser desenvolvidos como:

- Desenvolver estudos experimentais, onde os animais permaneçam em laboratórios, diminuindo assim a influencia das variáveis ambientais, assim como a possibilidade de mensurar o tempo, a dose e a via de exposição destes animais aos piretróides.
- Analisar os resíduos de piretróides em outros tecidos como o fígado, rim, sangue e no próprio tumor, uma vez que a distribuição destes resíduos acontece de forma heterogênea e correlacionar com os seus respectivos efeitos no desenvolvimento desta neoplasia.
- Cultivar as células do tumor mamário *in vitro* e submetê-las a exposição de diferentes metabólitos de piretróides, avaliando seu comportamento.
- Aumentar o número de animais estudados e correlacionar os níveis dos piretróides nos diferentes tecidos com a avaliação periódica de dos níveis hormonais, no intuito de avaliar seu efeito como desregulador hormonal.
- Padronizar a técnica de HPLC para análise de tecido adiposo e parenquimatosos em cães e outros animais, na intenção de verificar a exposição a diferentes resíduos de piretróides.
- Utilizar Bioindicadores e Biomarcadores de Contaminação Ambiental, para avaliar a toxicidade desses resíduos e seus efeitos deletério a saúde.

9. Referências*

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTINEZ, M.A. Use and abuse of pyrethrins and syntethetic pyrethroids in veterinary medicine. **Vet. J.**, v.182, p.7-20, 2009.

ANADÓN, A.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, M.A.; DIAZ, M.J.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. Toxicokinetics of lambdacyhalothrin in rats. **Toxicol. Lett.**, v.165, n.1, p.47-56, 2006.

ANDRADE, F.H.E. **Detecção de inseticidas piretróides em tecido adiposo e expressão morfológica de neoplasia maligna de mama em cadela**. 2008. 45f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ANTUOFERMO, E.; MILLER, M.A.; PIRINO, S.; XIE, J.; BADVE, S.; MOHAMMED, A.S.I. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs: a model of breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.16, p.2247-2256, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Legislação e resolução dos Piretróides**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legislacao.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

BILA, D.B.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quim. Nova**, v.30, n.3, p.651-666, 2007.

BIONDO, P.D.; BRINDLEY, D.N.; SAWYER, M.B.; FIELD, C.J. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. **J. Nutr. Biochem.**, v.19, n.12, p.787-796, 2008.

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

BITTNER, J.J. The causes and control of mammary cancer in mice. **Harvey Lect.**, v.42, p.221-246, 1948.

BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- Referências-Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996.468p.

BOYLE, P.; FERLAY, J. Cancer incidence and mortality in Europe. **Ann. Oncol.**, v.16, p.481, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação de substâncias para uso fitossanitário e domissanitário**: portarias do ANVISA/Ministério da Saúde. 2.ed. São Paulo: ILSI, 2000. 430p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Piretroides**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 08 Jul. 2009.

BRASILEIRO FILHO, G. Patologia geral: Bogliolo. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BREEN, M.; MODIANO, J.F. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans – man and his best friend share more than companionship. **Chromosome Res.**, v.16, p.145-154, 2008.

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

CABRAS, P. Pesticide: toxicology and residues in food. In: D'MELLO, J.P.F. (Ed.). **Food safety**: contaminants and toxins. Wallingford: CAB International, 2003. p.91-100.

CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.5, p.529-537, 2000.

CARREÑO, M.S.R.; PEIXOTO, S.; GIGLIO, A. Reposição hormonal e câncer de mama. **Rev. Soc. Bras. Cancer**, n.7, p.41- 50, 1999.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clín. Vet.**, v.11, n.61, p.56-64, 2006.

CERQUEIRA, G.S.; ARRUDA, V.R.; FREITAS, A.P.F.; OLIVEIRA, T.L.; VASCONCELOS, T.C.; MARIZ, S.R. Dados da exposição ocupacional aos agrotóxicos em um grupo assistido por uma unidade básica de saúde na cidade de cajazeiras, PB. **Rev. Inter.**, v.3, n.1, p.16-28, 2010.

CHAUHAN, L. K. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprothuron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.48, n.8, p.636-46,2007.

CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **J. Chromatogr. A**, v.754, p.367-395, 1996.

CHEN, H.; HU, G.; XIAO, J.; ZHOU, J.; XIAO, H.; WANG, X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, v.65, p.1419-1435, 2002.

COFFEY, D.S. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet and estrogens. **Urology**, v.57, suppl. 4A, p.31-38, 2001.

COOPER, G.M. **Oncogenes**. 2.ed. Boston: Jones and Barlett, 1995. 384p.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

CRAWFORD, M.J.; CROUCHER, A.; HUTSON, D.H. Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. **J. Agric. Food Chem.**, v.29, n.1, p.130-135, 1981.

CROW, J.A.; BORAZJANI, A.; POTTER P.M.; ROSS, M.K. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. **Toxicol Appl Pharmacol.**, n.221, p.1– 12, 2007.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579p.

DIDIO, L.J.A. **Tratado de anatomia aplicada**. São Paulo: Pólus, 1998. 287p.

DING, Y.; WHITE, C.A.; MURALIDHARA, S.; BRUCKNER, J.V.; BARLETT, M.G. Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v.810, p.221-227, 2004.

DRAGAN, Y.P.; PITOT, H.C. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**, v.13, p.739-750, 1992.

DUARTE, M.A.I. **Poluentes orgânicos persistentes**. 2002. Trabalho Conclusão de Curso (Graduação) - Escola Politécnica da Universidade do Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 813p.

EMBRAPA. **Manejo de solo e água**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/pesquisa/manejo.html>>. Acesso em: 11 dez. 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Special report on environmental endocrine disruption**: an effects assessment and analysis. Washington: LEPA, 1997. (EPA/630/R-96/012).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. **Pyrethrins**: report of the Cancer Assessment Review Committee. Third Evaluation. OPP-2005-0043-0010. 2004. Disponível em:<<http://docket.epa.gov/edkpub/do/EDKStaffItemDetailView>>. 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.

FANG, H.; TONG, W.; SHI, L.; BLAIR, R.; PERKINS, R.; BRANHAM, W.; HASS, B.; ZIE, Q.; DIAL, S.; MOLAND, C.; SHEEHAN, D. Structure–activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. **Chem. Res. Toxicol.**, v.14, p.280-294, 2001.

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

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; BRITO, T.; CACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C. **Patologia**: processos gerais. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINE, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na

determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, v.29, n.1, p.105-112, 2006.

GALIZIA, M.S., WAITZBERG, D.L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.16, p.79-89, 2001.

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

GARRIDO FRENICH, A.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M.J.; ARREBOLA, F.J. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.383, p.1106-1118, 2005.

GATENBY, R.A.; FRIEDEN, B.R. Application of information theory and extreme physical information to carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.62, p.3675-3684, 2002.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C.K.; MILNER, J.A. Diet and cancer prevention. **Eur. J. Cancer**, v.37, p.948-965, 2001.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 392p.

GIRAY, B.; GURBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol, **Toxicol. Lett.**, v.118, p.139-146, 2001.

GODIN, S.J.; CROW, J.A.; SCOLLON, E.J.; HUGHES, M.F.; DEVITO, M.J.; ROSS, M.K. Identification of rat and human cytochrome p450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. **Drug Metab Dispos.**, v.35, p.1664-1671, 2007.

GUIM, T.N. **Estudo dos critérios para classificação histológica, avaliação da sobrevivência e quantificação das AgNORs em tumores mistos mamários caninos**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia Eliseu Macie, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GUIM, T.N.; GAMBA, C.O.; MENDES, T.C.; FERNANDES, C.G.; BONEL-RAPOSO, J. **Estudo dos critérios para classificação histológica dos tumores mistos mamários caninos**. Pelotas: UFPel, 2007. Disponível em: <http://www.ufpel.tche.br/cic/2007/cd/pdf/CA/CA_01918.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2009.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia**: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. 2003. 90f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HELLMÉN, E. Complex mammary tumors in the female dog: a review. **J. Dairy Res.**, v.72, p.90-97, 2005.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.427-433, 2000.

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

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. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **O que é câncer?**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81>. Acesso em: 04 mar. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER – IARC. **Overall evaluations of carcinogenicity to humans**. Lyon: IARC, 1994. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>>. Acesso em: 12 mar. 2008.

ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. **J. Vet. Med. Sci.**, v.3, p.345-347, 2005.

JOBIM, P.F.C.; NUNES, L.N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I.B.M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate: **Ciênc. Saúde Colet.**, v.15, n.1, p.277-288, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J. Comp. Pathol.**, v.133, n.4, p.246-252, 2005.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species, **J. Nutr. Environ.**, v.9, p.37–46, 1999.

KIM, I.Y.; SHIN, J.H.; JIM, H.S.; LEE, S.J.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; MOON, H.J.; CHOL, K.S. Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using *in vitro* combination assay. **J. Reprod. Dev.**, v.50, p.245-255, 2004.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Artmed, 2004.

KOOISTRA, H.S.; GALAC, S.; BUIJTELS, J.J.C.W.M.; MEIJ, B.P. **Horm. Res.**, v.71, n.1, p.144–147, 2009.

KUNIMATSU, T.; YAMADA, T.; OSE, K.; SUNAMI, O.; KAMITA, Y.; OKUNO, Y. Lack of (anti-) androgenic or estrogenic effects of three pyrethroids (esfenvalerate, fenvalerate, and permethrin) in the Hershberger and uterotrophic assays. **Regul. Toxicol. Pharm.**, v.35, p.227-237, 2002.

LAFFIN, B.; CHAVEZ, M.; PINE, M. The pyrethroid metabolites 3-phenoxybenzoic acid and 3-phenoxybenzyl alcohol do not exhibit estrogenic activity in the MCF-7 human breast carcinoma cell line or Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v.10, p.1016, 2009.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. (Eds.). **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. 230p.

LATUSZYNSKA, J.; LUTY, S.; RASZEWSKI, G.; PRZEBIROWSKA, D.; TOKARSKA-RODAK, M. Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v.10, p.197-201, 2003.

LEMONS, H.M. Poluentes orgânicos persistentes. In: _____. **A intoxicação química do planeta**. Rio de Janeiro: Instituto Brasil PNUMA, 2001. (Informativo, 60).

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S.; KARLSSON, E.K.; JAFFE, D.B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J.L.; KULBOKAS, E.J.; ZODY, M.C. et al.

Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v.438, p.803-819, 2005.

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.

LUIZ, C.R.; OLIVEIRA, K.M.; BALESTRA, F.A.M.; NASCIMENTO, D.S.; FERREIRA, J.R. Estudo comparativo da irrigação da papila mamária em cães sem raça definida (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.41, p.20-24, 2004.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol. Rev.**, v.83, p.337-376, 2003.

McCARTHY, A.R.; THOMPSON, B.M.; SHW, I.C.; ABELL, A.D. Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. **J. Environ. Monit.**, v.8, p.197-202, 2006.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999. v.7.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa: State Press, 2002. p.575-606.

MOORE K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia clínica**. 7.ed. São Paulo: Elsevier, 2004. 632p.

MOULTON, J.E. Tumors of the mammary gland. In:____. **Tumors in domestic animais**. 3.ed. Los Angeles: University of California, 2002. p.518-550.

MUÑOZ-DE-TORO, M.; BELDOMENICO, H.R.; GARCIA, S.R.; STOKER, C.D.E.; JESUS, J.J.; BELDOMENICO, P.M.; RAMOS, J.G.; LUQUE, E.H. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. **Environ. Res.**, n.102, p.107-112, 2006.

[MUNSON, L.](#); [MORESCO, A.](#) Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast Dis.**, v.28, p.7-21, 2007.

NARDI, A.B; RODASKI,S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S. C.In:_____ DALECK, C.R.; NARDI, A.B; RODASKI,S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p. 372-378, 2008

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v.191, n.2-3, p.233-244, 2003.

NIETO, A.; PENA, L.; PEREZ-ALENZA, M.D.; SANCHEZ, M.A.; FLORES, J.M.; CASTANO, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor a in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Vet. Pathol.**, v.37, p.239-247, 2000.

OBERLEY, T.D. Oxidative damage and câncer. **Am. J. Pathol.**, v. 160, p. 403-8, 2002.

OLIVEIRA, L.O. Aspectos epidemiológicos da neoplasiamamária canina. **Acta Scient. Vet.**, v.31, n.2, p.105-110, 2003.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE LA CRUZ, L.F.P.; LOPES, C. Chemical carcinogenenesis. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.79, n.4, p.593-616, 2007.

OSBORNE, C.K.; SCHIFF, R. Estrogen-receptor biology: continuing progressand therapeutic implications. **J. Clin. Oncol.**, v.23, n.8, p.1616-1622, 2005.

PARROTT, N.; LUKACOVA, V.; FRACZKIEWICZ, G.; BOLGER, M.B. Predicting pharmacokinetics of drugs using physiologically based modeling - application to food effects. **AAPS J.**, v.11, p.45-53, 2009.

PERRY, M.J.; VENNERS, S.A.; BARR, D.B.; XU, X. Environmental pyrethroid andorganophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. **Reprod. Toxicol.**, p.113-118, 2007.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v.89, n.509, p.10-28, 1994.

PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; CARVALHO, T.; PISSARRA, H.; FERNANDES I. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. In: CURSO DE

CITOLOGIA PARA CLÍNICOS VETERINÁRIOS, 6., 2006, Lisboa. **Anais...** Lisboa: FMV-UTL, 2006.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J.H.; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, v.32, n.4, p.987-995, 2009.

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

PINTO, R.M.M.O.P. **Neoplasias mamárias em cadelas e gatas**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p.2280-2286, 1991.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. The multistage nature of chemically induced hepatocarcinogenesis in the rat. **Drug Metab. Rev.**, v.26, p.209-220, 1994.

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

PRESIBELLA, K.M. **Efeitos da associação dos pesticidas deltametrina e endossulfano sobre o sistema reprodutivo de ratos wistar**. 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognósticos. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v.97, n.543, p.119-127, 2002.

QUEIROGA, L.F.; PEREZ-AVANZA, D.; SILVAN, G.; PENÃ, L.; ILLERA, J.C. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.115, p.9-13, 2009.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RECENA, M.C.P.; PIRES, D.X.; CALDAS, E.D. Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v.15, n.357, p.1-3, 2005.

RICK, L.C.; RONALD, D.T.; JAMES, H.M.; DENNIS, B.D. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3 ed. São Paulo: MedVet, 2009, 478p.

RIPLEY, B.D. Pyrethroid insecticide residues on vegetable crops. **Pest. Manag. Sci.**, v.57, n.8, p.683- 687, 2001.

RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; JORDÃO JR., A.A.; PENTEADO, M.V.C.; MORENO, F.S. β -carotene inhibits persistent and stimulates remodeling GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.57, p.415-422, 1997.

ROCHA, D.C.C. **Ambiente em foco**. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br/?cat=45>>. Acesso em: 04 jul. 2009.

ROSSIT, A.; FROES, N. C. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**. n 10. p. 26-31. ago 2001.

RUTTEMAN, G.R.; KIRPENSTEIJN, J. Tumours of the mammary glands. In: DOBSON, J.M.; LASCELLES, B.D.X. (Eds.). **Manual of canine and feline oncology**. 2.ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2003. p.234-242.

SAITO, K.; TOMIGAHAR, Y.; OHE, N.; ISOBE, N.; NAKATSUKA, I.; KANEKO, H. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. **Toxicol. Sci.**, v.57, p.54-60, 2000.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Pyrethroids: a review. **Alim. Nutr.**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.

SHAFER, T.J.; MEYER, D.A.; CROFTON, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**. n.113, p.123–136, 2005.

SHEETS, L.P.; DOHERTY, J.D.; LAW, M.W.; REITER, L.W.; CROFTON, K.M., Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n.126, p.86–190, 2004.

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. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.23, n.1, p.41-45, 2001.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciênc. Rural**, v.34, p.625-633, 2004.

SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2002.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Vet. Clin. Small Anim. Pract.**, v.33, p.573-596, 2003.

SPENCER, C.I.; YUILL, K.H.; BORG, J.J.; HANCOX, J.C.; KOZLOWSKI, R.Z. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.

STERNLICHT, M.D. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Res.**, v.8, n.1, p.201, 2006.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p.768-780, 2003.

THOMAS, R.; SMITH, K.C.; OSTRANDER, E.A.; GALIBERT, F.; BREEN, M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. **Br. J. Cancer**, v.89, p.1530-1537, 2003.

UVA, P.; URISICCHIO, L.A.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v.10, n.135, p.20, 2009.

VIEIRA, H.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT)

para piretróides em água e análise por CG. **Quím. Nova**, v.30, n.3, p.535-540, 2007.

VIRAN, R.; ERKOÇ, F.Ü.; KOÇAK, H.P.O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.82-85, 2003.

WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.651-656.

WOOLLEN, B.H.; MARSH, J.R.; LAIRD, W.J.D.; LESSER, J.E. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. **Xenobiotica**, v.22, p.893-991, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard**. Geneva, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazarde/en> Acesso em: 18 set. 2008.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **International Program on Chemical Safety (IPCS)**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pds/pdsotter/class.pdf>>. Acesso em: jul. 2004.

YANG, D.; WANG, X.; CHEN, Y.; DENG, R.; YAN, B. Pyrethroid insecticides: isoform- dependent hydrolysis, induction of cytochrome p.450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.237, p.49-58, 2010.

ZEGURA, B.; LAH,T.T.; FILIPIC,M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, n.200, p. 59–68, 2004.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. Brasília: ANVISA, 2005. 1020p.

ZHAO, M.; ZHANG, Y.; LIU, W.; XU, C.; WANG, L.; GAN, J. Estrogenic activity of lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.5, p.1194-1200, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias: importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq. Ciênc. Saúde.**, v.15, p.98-202, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, n.1, p.38-41, 2001.

10. Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para a **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO:

A **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** - Publicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça - mantida pela Associação Cultural e Educacional de Garça, visa divulgar trabalhos originais, voltados para as áreas de conhecimento do âmbito em Medicina Veterinária e Zootecnia, na forma de artigos, ensaios, resenhas, resumos, notas técnicas e traduções.

1. Os trabalhos para apreciação poderão ser enviados pela Internet, no endereço soraya_sacco@rocketmail.com (atentando para o tamanho do arquivo que não deverá ultrapassar 3 Mb, já inclusos tabelas e gráficos) ou via correio (Rua das Flores n.º 740 - Bairro Labienópolis - CEP: 17400-000 - Garça/SP) em CD (devidamente identificado), gravado em editor de texto Word for Windows. Os textos não devem exceder 20 páginas com as seguintes especificações: página A4, fonte Times New Roman, corpo 12, entrelinha 1,5, com 3cm de margem superior, inferior, esquerda e direita.

2. Informar endereço completo e e-mail para contato futuro.

3. Serão aceitos trabalhos escritos nos seguintes idiomas: espanhol, inglês e português.

4. Apresentação dos trabalhos:

4.1. Página inicial, contendo:

* Título completo do artigo em LETRA MAIÚSCULA.

* Nome completo do(s) autor(es) (por extenso e apenas o SOBRENOME EM MAIÚSCULA).

* Filiação científica na seguinte ordem: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade - sigla, cidade, estado e país.

4.2. Segunda página, contendo:

* Resumo de, no máximo, 100 palavras e cinco palavras-chave (termos ou expressões que identifiquem o conteúdo do trabalho). O título, o resumo e as palavras-chave deverão ser no idioma do texto.

* Abstract e Key Words.

4.3. Corpo do texto:

* Sub-itens destacados em negrito, no mesmo corpo do texto, alinhados à esquerda.

* Texto contendo INTRODUÇÃO (contendo revisão e literatura), MATERIAS E MÉTODOS (resultados e discussões), CONCLUSÕES; AGRADECIMENTOS (Opcional) E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

* Notas de rodapé devem ser, na medida do possível, incluídas no corpo do texto ou apresentadas no final do texto após as referências bibliográficas.

* tabelas e gráficos deverão ser numerados consecutivamente em algarismos arábicos e encabeçados por seus respectivos títulos.

* fotografias e ilustrações poderão ser coloridas e devem ser inseridas no corpo do texto.

* Citações no corpo do texto deverão ser feitas pelo sobrenome do autor, entre parênteses e separado por vírgula da data de publicação Ex: (SILVA, 1984). Caso o nome do autor esteja citado no texto, deverá ser acrescentada a data entre parênteses. Por exemplo, "Silva (1984) aponta ...". Quando for necessário, especificar página(s), que deverá (ão) seguir-se à data, separada(s) por vírgula e precedida(s) de p., sem espaçamento (SILVA, 1984, p.128). As citações de

diversas obras de um mesmo autor, publicadas no mesmo ano, deverão ser discriminadas por letras em ordem alfabética, após a data, sem espaçamento (SILVA, 1984a; 1984b). Quando a obra tiver dois autores, ambos deverão ser indicados, ligados por ponto e vírgula (SILVA; SOUZA, 1987). No caso de três ou mais, indica-se o primeiro, seguido da expressão et al. (SILVA et al., 1986).

* Anexos e/ou Apêndices serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

4.4. Referências bibliográficas:

4.4.1. As referências bibliográficas deverão ser arroladas no final do trabalho, pela ordem alfabética do sobrenome do(s) autor(es), obedecendo às normas da ABNT (NBR 6023, de agosto de 2002). Ex: LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Metodologia do trabalho científico**. 2.ed. São Paulo: Atlas, 1986.

5. Serão publicados os trabalhos aprovados e recomendados por pareceristas das áreas correspondentes.

6. É vedada a reprodução dos trabalhos em outras publicações eletrônicas. Os direitos autorais dos trabalhos aceitos serão cedidos à Revista.

7. Os trabalhos que não estiverem de acordo com estas normas serão devolvidos ao(s) autor(es).

8. Os casos não previstos por estas Normas serão resolvidos pela Conselho Editorial da Revista.

9. Os dados e conceitos emitidos nos trabalhos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade dos autores.

**RESIDUES OF PYRETHROIDS IN THE ADIPOSE TISSUE ADJACENT TO
SPONTANEOUS MAMMARY CARCINOMA IN FEMALE DOGS**

BARIANI, Mario Henrique¹
ROCHA, Noeme Sousa²

¹Mestre em Patologia Veterinária - Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, São Paulo,
Brasil.
mario_bariani@yahoo.com.br

²Professora adjunta do Departamento de Clínica Veterinária , Serviço de Patologia
Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu,
São Paulo, Brasil.

ABSTRACT:

The exposure to environmental pollutants can be associated with the development of mammary cancer in female dogs. The objective was to identify pyrethroid alethrin, lambda-cialothrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin residues in the adipose tissue adjacent to the mammary gland with spontaneous carcinomas and correlate them with the morphology of the neoplasias. Thus, five grams of adipose tissue were collected from 30 female dogs and analyzed by the High Performance Liquid Chromatography exam. There was not a significant difference among the pyrethroids levels, the morphologic expression or the degree of malignity of the carcinomas analyzed by the Chi-square test.

Key Words: Female dogs; mammary tissue; carcinoma; pyrethroids.

RESUMO:

A exposição a contaminantes ambientais podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de mama em cadelas. O objetivo foi identificar e quantificar resíduos dos piretróides aletrina, cipermetrina, deltametrina, tetrametrina e lambda- cialotrina no tecido adiposo adjacente a mama com carcinomas espontâneos e correlacioná-los com a morfologia destas neoplasias. Para isso, cinco gramas de tecido adiposo foram coletadas de 30 cadelas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de piretróide, a expressão morfológica e o grau de malignidade dos carcinomas analisadas pelo teste do Qui-quadrado.

Palavras-chaves: Cadelas; tecido mamário, carcinoma, piretróides

INTRODUCTION

The term agrotoxic, is used generically to describe natural or synthetic chemical substances, responsible for the combat of parasites on farms (CALDAS & SOUZA, 2000; JOBIM et al., 2010). Developed initially as an agricultural defense, now its use has been dispersed embracing domisanitary products, domestic animals parasite control, and public health campaigns. Though thoroughly distributed due to the practicability, easy access and economical importance, these substances are potentially toxic and their residues can contaminate the environment (PRESIBELLA, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2010).

Among the agrotoxic residues that can contaminate the environment, the pyrethroid group is prominent, in spite of being the most widely used pesticide in the world, little has been done to evaluate its potential as a hormonal deregulator (GAREY & WOLF, 1998; KASAT et al., 2002). They are listed as such by international agencies like Environmental Protection Agency (EPA), responsible for the regulation of chemical substances in the United States (EPA, 1997).

Man's exposure along with other animals to pyrethroid residues is mainly through ingestion of residues, and secondly by direct dermal contact or inhalation of suspended particles in the air (WOOLLEN et al., 1992; SODERLUND et al., 2002). The biotransformation of pyrethroids absorbed orally happens initially by the hydrolysis of the initial composition in the gastrointestinal treatment (SODERLUND et al., 2002; ANADON et al., 2009; YANG et al., 2010).

The metabolites preceding these processes are distributed heterogeneously way and deposited mainly in the liver, kidneys and adipose tissue interacting with the cellular representatives. In these organs, the metabolite levels decrease quickly, with exception to the adipose tissue due to lipophilic characteristics of the metabolites. The metabolism results in the formation of more polar compositions, excreted as such by the urine conjugated in form with endogenous substrates (taurine, glycine and PAPS) (SODERLUND et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Pyrethroids such as cypermethrin and the deltamethrin, are classified by the International Agency of Research on Cancer (IARC), as a level 3, in other words, an inconclusive carcinogen to man and the World Health Organization (WHO) defines

deltamethrin as a moderately dangerous insecticide (IARC, 2008; EPA, 2008). The metabolites of the pyrethroids can present xenoestrogen characteristics, which is a substance that mimics the action of the feminine sexual hormone (FANG et al., 2001). For some authors the cypermethrin, tetramethrin and allethrin has been shown to induce the oxidative stress, generating active species of oxygen (AEO) in experiments with mice (KALE et al., 1999; GIRAY et al., 2001). The oxidative stress and the production of AEO may cause damage to DNA, acting as a chemical carcinogen responsible mainly for the uncontrolled growth of mesenchymal cells (ZEGURA et al., 2004).

However not all studies demonstrate that pyrethroids and their metabolites possess estrogenic activity (SAITO et al., 2000; KUNIMATSU et al., 2002; KIM et al., 2004). In relation to the carcinogenicity, few reports are found in specialized literature on the subject. Though like other chemical substances of established performance, the occurrence of these effects depend on their molecular structure, the dose and the intensity of exposure (GARRIDO et al., 2005). In the current literature there is no work that relates the effect of pyrethroids in mammary tumors in female dogs.

The development of mammary spontaneous carcinoma in female dogs can involve feminine steroid hormones. These hormones are responsible for approximately 50% of all the neoplastic disorders in this species (MISDORP, 2002; GUIM et al., 2007; LANA et al., 2007). The importance of this type of neoplasia is due to the growth in the number of animals assailed by the disease in the last decade, as well as presenting likeness in several aspects to mammary cancer in women that rouses the scientific interest in the study using the female dog as an excellent experimental model for both species (ANTUOFERMO, 2007; LAFFIN et al., 2009; UVA et al., 2009; KOOISTRA et al., 2009).

The prognosis for patients with this type of neoplasia depends on the diagnosis necessary in the initial disease stage (ZUCCARI et al., 2001). The primary diagnosis of the tumor type is made by the cytopathologic exam (ZUCCARI et al., 2001; QUEIROGA & LOPES, 2002; PELETEIRO et al., 2006; RICK et al., 2009). The histopathological exam is the most appropriate method for the classification of mammary tumors in female dogs, especially in the characterization of malignant neoplasias (MISDORP, 1999).

According to the World Health Organization (OMS), tumors can be classified morphologically as benign, malignant, indifferent, hyperplasia and mammary dysplasia. Among carcinomas they are classified: in situ, complex, simple with tubulopapillary, solid, anaplastic subtypes and then there are the special that include the fusiform cells carcinoma, squamous cell, mucinous and rich in lipids (MISDORP et al., 1999). The degree of neoplasias is an attempt to evaluate its malignancy or aggressiveness, based on the characterization of the tumor cells and the amount of mitoses (FONSECA & DALECK, 2000; LANA et al., 2007).

The etiology of the malignant mammary tumors in female dog is still not elucidated, but believed that it is related to its susceptibility to several factors of complex interactions, being external or internal to the organism and being both interlinked. The external causes are related to the environment and the habits of the animal (ZUCCARI et al., 2008; INCA, 2010).

The environmental effect is linked as a mammary carcinogen due to the vulnerability animals have to the artificial substances dispersed daily in the atmosphere. Among the residual pollution agrotoxics are the principal by-products in the industry as well as domestic garbage. According to the National Institute of Cancer (2010), 80% of the new mammary cancer cases in women are associated to environmental factors. The established proximity between the owner and pet determines the exposure level to the same environmental agents in both species (RIPLEY, 2001; ANTUOFERMO, 2007; JOBIM et al., 2010).

Considering the mentioned aspects, we become aware of the need for greater studies in pyrethroid performance as endocrine disruptores and possibly as cancerous agents. The objective of this work is to identify and to establish levels of residues of the pyrethroids alethrin, cypermethrin, deltamethrin, tetramethrin and lambda-cialothrin in the adipose tissue adjacent to the mammary gland of female dogs with and without carcinoma, so that one can discover any relationship of this pollutant in the mammary carcinogen.

MATERIAL & METHODS

In the present study, 30 female dogs were collected without predilection of race, with ages between five and 13 years, with clinical histopathologic diagnosis of spontaneous mammary carcinoma, assisted in the Veterinary Hospital of Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) of Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus of Botucatu/SP and in the Veterinary Hospital of Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/SP (FAMED), maintained by the Associação Cultural e Educacional de Garça/SP (ACEG).

In order to evaluate the corporal mass and determinate the physical state (Figure 1) the criteria described by HILL'S (1999) was used. The animals were classified as: thin, where the ribs are easily tangible, without fat covering. The base of the tail has prominent bones, abdominal curvature accentuated and silhouette of the waist quite accentuated. Ideal weight characterized by the easily tangible ribs, with little fat covering. The base of the tail with soft contour, tangible bones with fine fat layer and obese, when the ribs are difficultly tangible, with moderate to thick fat covering and the base of the tail arched.

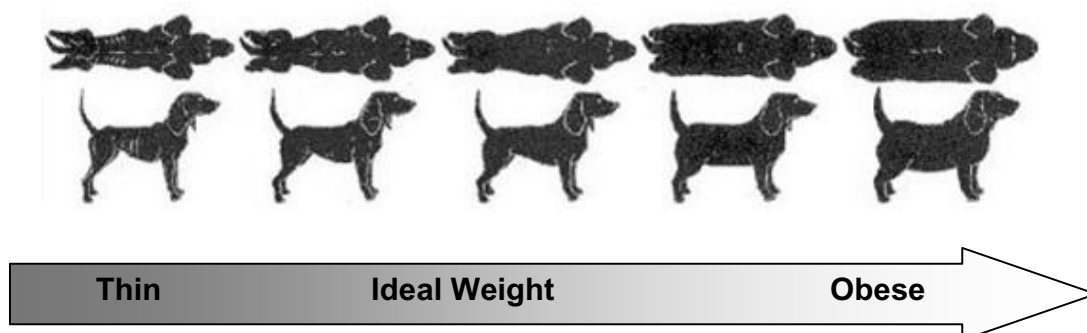


FIGURE 1 – Characterization of body mass by Hill's (1999).

After complete clinical exam of the animals and registration of data, the cytopathology exam was used to characterize preliminarily the increase in volume as a neoplasia with mammary origin. In this procedure disposable hypodermic needles 13 x 4,5 mm were used to puncture mammary nodules smaller than 1,0 cm and 30 x 7 and 30 x 8 mm and for nodules with a diameter surpassing 1,0 cm disposable hypodermic syringes of 10 ml. The material obtained was distended on to hystologic slides. Part of the slides were fastened with methanol p.a. (Merck, Darmstadt, Germany) and ethanol 95% (Merck,

Darmstadt, Germany) and stained by May-Grünwald Giemsa's techniques and Papanicolaou, respectively. The samples were examined in the light microscope (ZEISS - I Model AXIO Imager A1).

The animals with positive cytopathologic diagnosis of mammary neoplasia were submitted to a partial or radical mastectomy. The surgical pieces were directed to the Service of Veterinary Pathology of FMVZ/UNESP, campus of Botucatu for analysis anatomopathologic and material processing for histopathology exam. The fragments of carcinomas were fixed in tamponade formalin 10%, processed routinely and stained with Hematoxylin and Eosin. The material was read in light microscope (ZEISS - I Model AXIO Imager A1) and classified following the criteria adopted by the World Organization of Health (MISDORP et al., 1999).

Five grams of the adipose tissue adjacent to the carcinomas was removed, frozen at a temperature of -4°C until the analysis of the quantitative High Performace Liquid Chromatography (HPLC) technique, according to the method of BISSACOT and VASSILIEFF (1997) modified for processing these sample types. For analysis, the model CG 480C was used from CEATOX, Institute of Biosciences - UNESP/Campus of Botucatu-SP. In order to read the levels of pyrethroids an ultraviolet detector, model CG 435B with a wavelength of 266nm, was used integrating the pattern of the peaks with attenuation of 2.0 and inclination of 300 with a speed of 10mm/min.

RESULTS & DISCUSSION

This work identified and quantified the alethrin, cypermethrin, deltamethrin, tetramethrin and lambda-cialothrin levels in the adjacent adipose tissue of the mammary gland in female dogs with the HPLC technique, following the same method used by ANDRADE (2008). The analysis demonstrated sensibility in the quantitative and qualitative determination of the residues, proving its efficiency and adaptability in the analysis of different substances as described by other authors (BISSACOT & VASSILIEFF, 1997; ANDRADE, 2008).

The corporal weight of the animals was between 3,3 and 40 kg, eight animals were obese (26,7%); 21 regular (70%) and only one was classified as thin (3,3%). The analysis of the adjacent adipose tissue of the mammary gland, in the present study, demonstrated that the animals presented varied levels of residues of pyrethroids regardless of the classification of corporal mass. The largest pyrethroid indexes were detected in animals considered regular, followed by thin and lastly obese. Although the number of studied animals is small, the quantification of these pyrethroids can demonstrate that the distribution of residues occurs in a non-homogeneous way in the different tissues, as related by CRAWFORD et al. (1981); VIRAN et al. (2003) and ANADÓN, et al. (2006).

The lipophilic influence of some pyrethroid metabolites can be linked to the deposition of a larger concentration in the adipose tissue (CRAWFORD et al., 1981; VIRAN et al., 2003). In thin animals, even if in smaller amounts, the residues come in larger concentrations, due to the low volume of available adipose tissue in the body of the animal. This doesn't happen in obese animals, although that supposition should be confirmed with greater study.

The cytopathology and histopathology exams were used in the experiment, respectively, in the screening of animals and identification of the tumor, as described by Zuccari et al. (2001); Queiroga & Lopes (2002); Peleteiro et al. (2006); and in the morphologic classification and expression of the cellular criteria of malignancy as suggested by Misdorp, (1999); Karayannopolou et al. (2005); Cavalcanti & Cassali (2006).

The malignant neoplasias found with larger incidence were complex (56,6%) (Figure 4 and 5), followed by simple (43,4%) (2 and 3) with its subclasses. Contrary to the frequency found by Burini, (2002); Oliveira, (2003); Hataka, (2004); relating simple carcinoma, followed by complex carcinoma.

The use of these exams together demonstrated to be an important tool in the diagnosis routine and research due to the low invasion degree in the collection of samples of the cytopathology and the amount of information obtained through histopathology, as described by other authors (CAVALCANTI & CASSALI, 2006; RICK et al., 2009).

Afterward, the carcinomas were classified by their degree of malignancy I, II and III (Table 1).

TABLE 1 – Carcinomas histopathologic classification and graduation according to the degree of malignity.

Histopathologic Classification	n	Degree I	Degree II	Degree III
Simple Carcinoma	13	4 (13,3%)	4 (13,3%)	5 (16,7%)
Complex Carcinoma	17	1 (3,3%)	7 (23,3%)	9 (30%)
X²=3,867		P=0,1447		

There is no difference observed ($p > 0,05$) by Chi – square test.

In the present study a significant difference in relationship of the degree of malignancy in different carcinomas and the levels of pyrethroids found in the adipose tissue adjacent to the tumor was not observed.

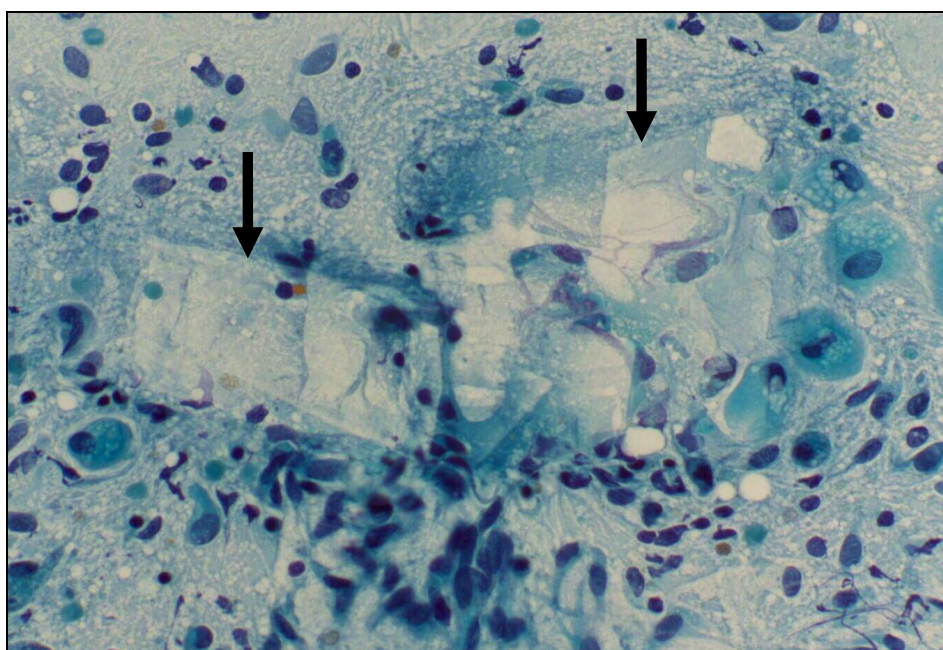


FIGURE 2 – Cytopathological exam: female dog simple mammary carcinoma, the presence of cholesterol crystals is noted (arrow) among epithelial neoplastic cells. Papanicilau,40X.

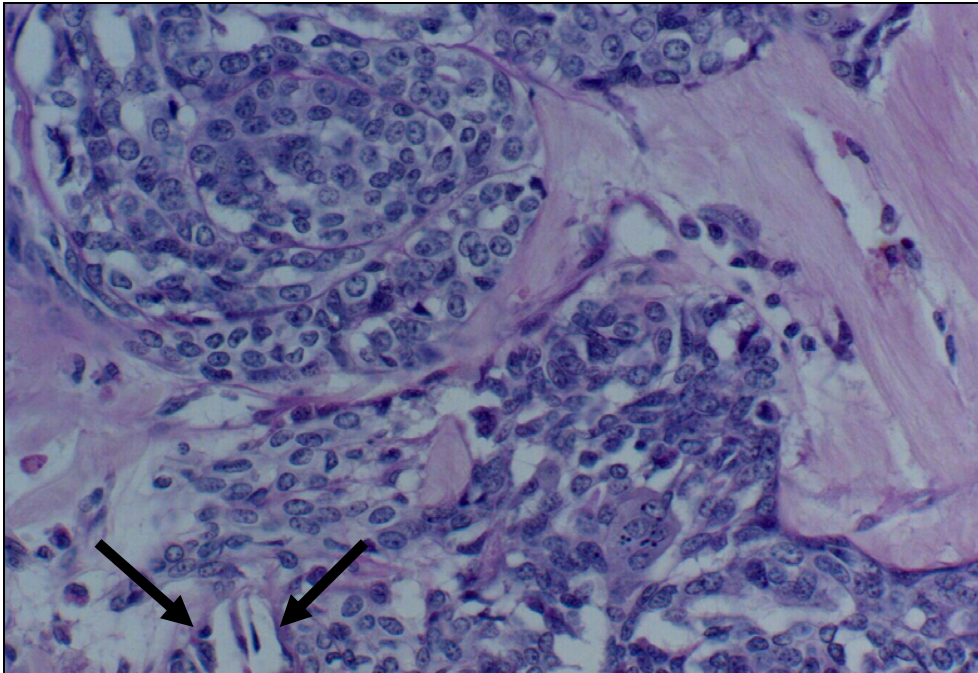


FIGURE 3- Histopathological exam: female dog simple mammary carcinoma, the presence of cholesterol crystals is noted (arrow) among epithelial neoplastic cells, forming alveolar arrangements. H.E., 40X.

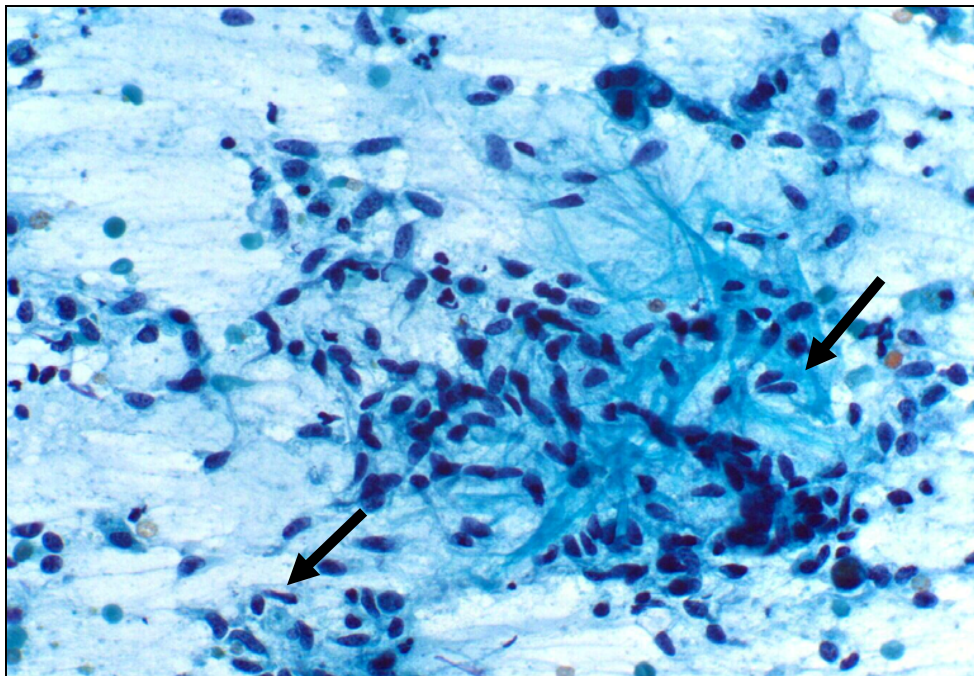


FIGURE 4 - Cytopathological exam: female dog complex mammary carcinoma, epithelial and mesenchymal cellular components, presence of fusiform cells that look like myoepithelial cells (arrow). Papanicolau, 20X.

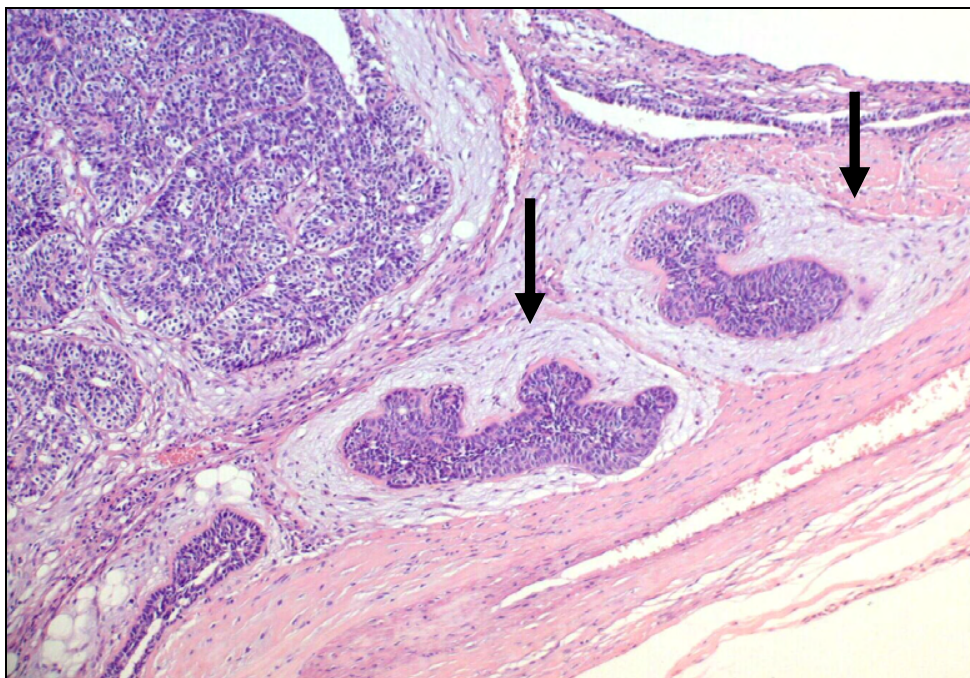


FIGURA 5 - Histopathological exam: female dog complex mammary carcinoma; acinar proliferation of epithelial neoplastic cells, involved by amorphous mixed tissue (arrow). H.E, 20X.

The carcinomas were located in one or multiple mammary glands. When the masses were located in just one area (28/30), the most affected mammary glands were the abdominals (50%), followed by the mammary inguinal (23,3%) and thoracic (20%). When the masses were multiple (02/30), the lesions prevalence was observed on the left abdominal area (3,3%) and by the whole right side extension of the mammary glands (3,3%).

In relation to the location of the studied neoplasias, the larger predilection was observed by the inguinal and abdominal mammary glands. The data found is similar to that described by other authors (QUEIROGA & LOPES, 2002; OLIVEIRA et al., 2003; HELLMÉN, 2005). The reason for which these glands are attacked more is possibly due to the larger amount of mammary parenchyma, suffering a larger proliferative response due to the effects of estrogen. The sensibility and the exposure to cancerous chemicals elevates the risks of developing mammary cancer (NARDI et al., 2008), though in the present study no differences were observed with significant relationship to the location of the tumors in the

mammary tissue and the amount of residues of detected pyrethroids in the adjacent adipose tissue (Table 2).

TABLE 2 – Comparison among frequency, location of the mammary carcinoma and the corporal mass.

Localization	Corporal Score		
	Thin	Obese	Ideal Weight
Right abdominal cranial	0	2	5
Left abdominal cranial	0	0	3
Right abdominal caudal	0	1	1
Left abdominal caudal	0	2	2
Right inguinal	1	0	3
Left inguinal	0	2	1
Multiple in entire right mammary chain	0	0	1
Left thoracic Abdominal	0	0	1
Right thoracic Caudal	0	0	1
Left thoracic Caudal	0	0	1
Right thoracic Cranial	0	0	1
Thoracic Caudal	0	1	1
X²=15,221			P=0,8526

There is no difference observed ($p>0,05$) by Chi – square test. The attacked mamma doesn't depend of the corporal score.

The comparison between the concentration of pyrethroid residues and the morphologic expression of carcinomas diagnosed by the histopathology exam didn't demonstrate significant differences (Table 3), however the largest prevalence was verified in the compound carcinomas in relation to the simple.

TABLE 3 – Comparison among the pyrethroids levels diagnosed in carcinomas

Neoplasias	Pyrethroids residue presence		N
	Presence	No presence	
Simple Carcinoma	5	8	13
Complex Carcinoma	11	6	17
X²=2,038			P=0,533

There is no difference observed ($p>0,05$) by Chi – square test. The attacked mamma doesn't depend of pyrethroids residues presence.

That proliferation of the mesenchymal component in the complex carcinoma might have been a consequence of pyrethroid residues' influence that was deposited in the tissue. The metabolism of the pyrethroid residues, as well as other chemical substances, occurs by the action of a variety of enzymes, that can alter the expression of some genes when they act in an exacerbated way, turning the metabolites into eletrophilic chemicals, allowing them to link to composed DNA covalents, acting as an indirect chemical carcinogen (IARC, 2008).

Another way that the chemical residues of the pyrethroids can be corroborating in this process, could be related to oxidative stress, which happens during the disintoxication process of tissues. Consequently this process occurs in the production of AOE, responsible for the I stimulate of cellular multiplication, mainly mesenchymal cells in different organs such as the liver, kidney, mediastine and also in the mammary gland (ZEGURA et al., 2004).

The concentration of the pyrethroids in the tissue adjacent to the spontaneous mammary carcinomas in female dogs although it has not demonstrated a significant influence in the development of mammary neoplasias or its performance as a direct or indirect carcinogen, its action in the organism during lingering periods of exposure is not conclusive (SHEETS et al., 2004; SHAFER et al., 2005; ANADON et al., 2009). Recent studies indicate that exist enough evidence for us to study with greater attention the performance of these residues compositions and performance of such in different animals (GAREY & WOLFF, 1998; CHEN et al., 2002; ZHAO et al., 2008; YANG et al., 2010).

CONCLUSIONS

Larger indexes of complex carcinoma were observed in animals that presented pyrethroid residues in the adjacent adipose tissue of the mammary gland. The study demonstrated that the dog can serve as a biological model in the identification and quantification of environmental residues that can be involved in the development of cancer including the mammary gland.

REFERENCES

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTINEZ, M.A. Use and abuse of pyrethrins and syntethetic pyrethroids in veterinary medicine. **Vet. J.**, v.182, p.7-20, 2009.

ANADÓN, A.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ, M.A.; DIAZ, M.J.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. Toxicokinetics of lambdacyhalothrin in rats. **Toxicol. Lett.**, v.165, n.1, p.47-56, 2006.

ANDRADE, F.H.E. **Detecção de inseticidas piretróides em tecido adiposo e expressão morfológica de neoplasia maligna de mama em cadela.** 2008. 45f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ANTUOFERMO, E.; MILLER, M.A.; PIRINO, S.; XIE, J.; BADVE, S.; MOHAMMED, A.S.I. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs: a model of breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.16, p.2247-2256, 2007.

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

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

CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pública**, v.34, n.5, p.529-537, 2000.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clín. Vet.**, v.11, n.61, p.56-64, 2006.

CERQUEIRA, G.S.; ARRUDA, V.R.; FREITAS, A.P.F.; OLIVEITA, T.L.; VASCONCELOS, T.C.; MARIZ, S.R. Dados da exposição ocupacional aos agrotóxicos em um grupo assistido por uma unidade básica de saúde na cidade de cajazeiras, PB. **Rev. Inter.**, v.3, n.1, p.16-28, 2010.

CHEN, H.; HU, G.; XIAO, J.; ZHOU, J.; XIAO, H.; WANG, X. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, v.65, p.1419-1435, 2002.

CRAWFORD, M.J.; CROUCHER, A.; HUTSON, D.H. Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. **J. Agric. Food Chem.**, v.29, n.1, p.130-135, 1981.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis.** Washington: LEPA, 1997. (EPA/630/R-96/012).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. **Pyrethrins: report of the Cancer Assessment Review Committee. Third Evaluation.** OPP-2005-0043-0010. 2004. Disponível em: <<http://docket.epa.gov/edkpub/do/EDKStaffItemDetailView>>. Acesso em: 23 jan. 2008.

FANG, H.; TONG, W.; SHI, L.; BLAIR, R.; PERKINS, R.; BRANHAM, W.; HASS, B.; ZIE, Q.; DIAL, S.; MOLAND, C.; SHEEHAN, D. Structure–activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. **Chem. Res. Toxicol.**, v.14, p.280-294, 2001.

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

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

GARRIDO FRENICH, A.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M.J.; ARREBOLA, F.J. Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.383, p.1106-1118, 2005.

GUIM, T.N. **Estudo dos critérios para classificação histológica, avaliação da sobrevida e quantificação das AgNORs em tumores mistos mamários caninos.** 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia Eliseu Macie, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GIRAY, B.; GURBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol, **Toxicol. Lett.**, v.118, p.139–146, 2001.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas.** 2003. 90f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HELLMÉN, E. Complex mammary tumors in the female dog: a review. **J. Dairy Res.**, v.72, p.90-97, 2005.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **O que é câncer?** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81>. Acesso em: 04 mar. 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER – IARC. **Overall evaluations of carcinogenicity to humans**. Lyon: IARC, 1994. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>>. Acesso em: 12 mar. 2008.

ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. **J. Vet. Med. Sci.**, v.3, p.345-347, 2005.

JOBIM, P.F.C.; NUNES, L.N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I.B.M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate: **Ciênc. Saúde Colet.**, v.15, n.1, p.277-288, 2010.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **J. Comp. Pathol.**, v.133, n.4, p.246-252, 2005.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues in pyrethroid toxicity: possible involvement of reactive oxygen species, **J. Nutr. Environ.**, v.9, p.37-46, 1999.

KIM, I.Y.; SHIN, J.H.; JIM, H.S.; LEE, S.J.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; MOON, H.J.; CHOL, K.S. Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using *in vitro* combination assay. **J. Reprod. Dev.**, v.50, p.245-255, 2004.

KOOISTRA, H.S.; GALAC, S.; BUIJTELS, J.J.C.W.M.; MEIJ, B.P. **Horm. Res.**, v.71, n.1, p.144-147, 2009.

KUNIMATSU, T.; YAMADA, T.; OSE, K.; SUNAMI, O.; KAMITA, Y.; OKUNO, Y. Lack of (anti-) androgenic or estrogenic effects of three pyrethroids (esfenvalerate, fenvalerate, and permethrin) in the Hershberger and uterotrophic assays. **Regul. Toxicol. Pharm.**, v.35, p.227-237, 2002.

LAFFIN, B.; CHAVEZ, M.; PINE, M. The pyrethroid metabolites 3-phenoxybenzoic acid and 3-phenoxybenzyl alcohol do not exhibit estrogenic activity in the MCF-7 human breast carcinoma cell line or Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v.10, p.1016, 2009.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. (Eds.). **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; LIPSCOMB, T.P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, World Health Organization Colaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa: State Press, 2002. p.575-606.

NARDI, A.B; RODASKI,S.; ROCHA, N.S.; FERNANDES, S. C.In:____ DALECK, C.R.; NARDI, A.B; RODASKI,S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p. 372-378, 2008.

OLIVEIRA, L.O. Aspectos epidemiológicos da neoplasiamamária canina. **Acta Scient. Vet.**, v.31, n.2, p.105-110, 2003.

PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; CARVALHO, T.; PISSARRA, H.; FERNANDES I. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. In: CURSO DE CITOLOGIA PARA CLÍNICOS VETERINÁRIOS, 6., 2006, Lisboa. **Anais...** Lisboa: FMV-UTL, 2006.

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

PRESIBELLA, K.M. **Efeitos da associação dos pesticidas deltametrina e endossulfano sobre o sistema reprodutivo de ratos wistar**. 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognósticos. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v.97, n.543, p.119-127, 2002.

RICK, L.C.; RONALD, D.T.; JAMES,H.M.; DENNIS, B.D. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3 ed. São Paulo: MedVet, 2009, 478p.

RIPLEY, B.D. Pyrethroid insecticide residues on vegetable crops. **Pest. Manag. Sci.**, v.57, n.8, p.683- 687, 2001.

SAITO, K.; TOMIGAHAR, Y.; OHE, N.; ISOBE, N.; NAKATSUKA, I.; KANEKO, H. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. **Toxicol. Sci.**, v.57, p.54-60, 2000.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Pyrethroids: a review. **Alim. Nutr.**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.

SHAFER, T.J.; MEYER, D.A.; CROFTON, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**. n.113, p.123–136, 2005.

SHEETS, L.P.; DOHERTY, J.D.; LAW, M.W.; REITER, L.W.; CROFTON, K.M., Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. n.126, p.86–190, 2004.

SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2002.

UVA, P.; URISICCHIO, L.A.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v.10, n.135, p.20, 2009.

VIRAN, R.; ERKOÇ, F.Ü.; KOÇAK, H.P.O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.82-85, 2003.

WOOLLEN, B.H.; MARSH, J.R.; LAIRD, W.J.D.; LESSER, J.E. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. **Xenobiotica**, v.22, p.893-991, 1992.

YANG, D.; WANG, X.; CHEN, Y.; DENG, R.; YAN, B. Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome p.450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.237, p.49-58, 2010.

ZEGURA, B.; LAH,T.T.; FILIPIC,M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. **Toxicology**, n.200, p. 59–68, 2004.

ZHAO, M.; ZHANG, Y.; LIU, W.; XU, C.; WANG, L.; GAN, J. Estrogenic activity of

lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.5, p.1194-1200, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias: importância dos marcadores imunohistoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq. Ciênc. Saúde.**, v.15, p.98-202, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, n.1, p.38-41, 2001.

Projeto Neoplasia em Mama de Cão**Ficha de Identificação, Exame Clínico e Anatomopatológico**

RG n°: _____ Exame Histológico n°: _____

Exame Citopatológico n°: _____

Data: ____/____/____.

Proprietário: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Espécie: _____ Raça: _____ Idade: _____

Sexo: M F Peso: ____ kg

Pelagem: _____ Coloração: _____

Porte: Pequeno Médio Grande Massa Corpórea: Magro Normal Obeso Origem: Doméstica Urbana (cão de rua) Rural Alimentação: Ração Comida caseira Ração e comida caseira Outros Vacinação: Anti-Rábica Demais vacinas 1ª dose 2ª dose 3ª dose Vermifugação: Tipo de vermífugo: _____ Forma oral Forma injetável

Higienização do ambiente em que o animal vive

Produtos utilizados: _____

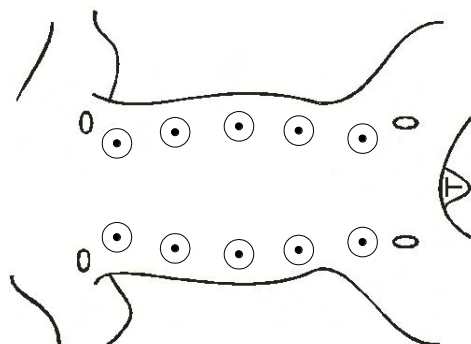
Uso de inseticidas

Produtos utilizados: _____

Tempo de evolução do tumor: _____

Teve cria: Sim n°: _____ NãoTeve aborto: Sim n°: _____ NãoAnticoncepcional: Sim, qual? _____ NãoSecreção vaginal: Sim, quando? _____ Não

Distribuição da lesão na cadeia mamaria da cadela (Esquema)



Características da(s) neoplasia(s) – marcar o tamanho correspondente e enumerar o item aspecto.

Cadeia mamaria direita

- M₁ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₂ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₃ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₄ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₅ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm

Cadeia mamaria esquerda

- M₁ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₂ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₃ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₄ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm
 M₅ – < 2cm >2 até 5cm > 5cm

ASPECTO ⇨ **❶** Integra **❷** Ulcerada **❸** Cística

Outra localização (dura, mole, flutuante, cística): _____

Coloração: _____

Secreção? Sim _____

Não .

Edema de membros? Sim , qual(is): _____

Não .

Linfonodos aumentados? Sim , qual(is): _____

Não .

Início dos sintomas: _____

Indicação de cirurgia: Sim , quando? _____ Não .

Indicação de eutanásia: Sim , quando? S _____ Não .

Indicação de tratamento: Sim , quando? _____ Não .