

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE RESÍDUOS PIRETRÓIDES
E GRAUS DE AGRESSIVIDADE
DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE CADELAS**

MARCIA MOLETA COLODEL

Botucatu, maio de 2011.

MARCIA MOLETA COLODEL

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE RESÍDUOS PIRETRÓIDES
E GRAUS DE AGRESSIVIDADE
DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE CADELAS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutora em Medicina Veterinária.

Orientadora: **Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha**

Botucatu, maio de 2011.

MARCIA MOLETA COLODEL

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE RESÍDUOS PIRETRÓIDES
E GRAUS DE AGRESSIVIDADE
DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE CADELAS**

Tese para obtenção do grau de doutora

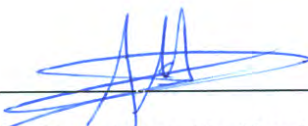
COMISSÃO JULGADORA



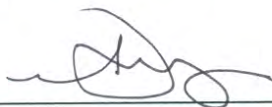
Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha – FMVZ/UNESP



Profa. Dra. Vera Maria Villamil Martins – CAV/UDESC



Prof. Dr. Alaor Aparecido Almeida – IBB/UNESP



Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues – FMB/UNESP



Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira – FMVZ/UNESP

Botucatu, 13 de maio de 2011.

ESTA PESQUISA FOI FINANCIADA PELAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:

Universidade Estadual Paulista – **UNESP**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**

Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – **FUNDUNESP**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – **CAPES**

Dedicatória

DEDICO...

Ao Nilson Prudêncio de Oliveira

Pelo amor, carinho, compreensão, estímulo, por se fazer presente e pelo apoio incondicional de todas as formas e em todos os momentos.

Aos meus pais, Sebastião de Almeida Colodel e Rosa Moleta Colodel

Pelo exemplo de vida, por não medirem esforços, pelo incessante incentivo e pelos ensinamentos transmitidos que formaram os alicerces da minha história.

Agradecimientos

SEREI ETERNAMENTE GRATA...

À Profa. Dra. *Neeme Sousa Rocha*, pela incansável orientação, por acreditar em mim e me proporcionar esta experiência enriquecedora, tanto profissional quanto pessoal e pela atenção e transparência ao transmitir seus conhecimentos. Todo meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. *Edison Martins* e à Profa. Dra. *Vera Maria Villamil Martins* por auxiliarem na elaboração do projeto e na confecção da tese, pela disponibilidade e interesse em julgar este trabalho, pelo estímulo constante e amizade.

Ao Prof. Dr. *Julio Lopes Sequeira*, Prof. Dr. *Alaor Aparecido Almeida* e a Profa. Dra. *Maria Aparecida Custódio Domingues*, pela disponibilidade e interesse em julgar este trabalho.

À Profa. Dra. *Renee Laufer Amorin* por me aceitar em seu laboratório e permitir que a primeira etapa deste trabalho fosse realizada.

À Profa. Dra. *Daisy Maria Favero Salvadori*, ao Prof. Dr. *Luiz Fernando Barbisan*, e toda a equipe do Laboratório de Toxigenômica e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina/UNESP/Botucatu/SP e do Laboratório de Imunoistoquímica e Eletroforese do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu/SP, por toda disponibilidade e ajuda constante na realização do Ensaio Cometa.

A toda equipe do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu/SP, em especial ao Prof. Dr. *Alaor Aparecido Almeida* e ao *João Leandro Chaguri* pelo empenho e zelo nas análises toxicológicas.

À equipe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo/São Paulo/SP, em especial ao Prof. Dr. *Rafael Malagoli Rocha* e ao *Carlos Nascimento* pela confecção do TMA.

Aos professores, residentes e funcionários dos Serviços de Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Reprodução e Anestesiologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP e em especial a Profa. Dra. *Maria Denise Lopes* pela ajuda fundamental na colheita do material.

À *Fernanda Carmelo Figueiroa* e ao *Breno Souza Salgado*, pelo auxílio nas análises histopatológicas e imunoistoquímicas.

Às alunas de iniciação científica da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP *Yara de Oliveira Brandão*, *Verônica Molina* e *Tarini Cristina Costa* pelo auxílio e por dividirem comigo esse trabalho.

À *Isabelle Ferreira* pelo coleguismo, disponibilidade e ajuda constante que facilitaram muito a realização deste trabalho e minha estada em Botucatu.

Ao *Rodolfo Françon Araújo Ventura* e a *Marcela Marcondes Pinto Rodrigues* pela amizade sincera, convívio, apoio e auxílio inestimável.

A todos os pós-graduandos e residentes do Serviço de Patologia Veterinária e Ornitopatologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, pelo acolhimento, palavras amigas, e disponibilidade em ajudar.

Ao *Maury Raul*, *Claudinei Domingues* e *Maria Valéria Dalanezi* pela agradável convivência, pelo carinho e pelo auxílio técnico direto e indireto.

Aos funcionários da pós-graduação em Medicina Veterinária–FMVZ/UNESP/Botucatu/SP *José Roberto de Salla Júnior*, *Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel*, *Patrícia Luciane Souza Ramos*, pela atenção e ajuda singular.

À FAPESP e a CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, pela oportunidade; ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Departamento de Clínica Veterinária e ao Serviço de Patologia Veterinária pela acolhida.

Aos meus irmãos *Edilson Moleta Colodel* e *Edson Moleta Colodel*; aos meus sobrinhos *Edilson Moleta Colodel Júnior*, *Junian Freitas Colodel*, *Gabriel El-Jassa Colodel* e *Enzo El-Jassa Colodel*; e minha cunhada *Solange Freitas Colodel* pelo incentivo, mesmo distante.

A Deus por permitir que este trabalho se tornasse possível.

Sumário

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Piretróides: propriedades físico-químicas.....	23
2.2 Piretróides: toxicocinética e tecidos alvo.....	24
2.3 Efeitos toxicológicos agudos dos piretróides.....	25
2.4 Efeitos toxicológicos subcrônicos e crônicos dos piretróides.....	25
2.5 Piretróides e o câncer.....	26
2.5.1 Câncer e carcinogênese.....	26
2.5.2 Possíveis mecanismos envolvidos na carcinogênese por piretróides.....	29
2.5.3 Carcinogenicidade experimental dos piretróides.....	31
2.5.4 Dados epidemiológicos.....	33
2.6 Câncer de mama.....	36
2.7 Piretróides e o câncer de mama.....	38
3. OBJETIVOS.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Regulamentação do estudo	44
4.2 Seleção dos animais.....	44
4.3 Diagnóstico citopatológico.....	44
4.4 Diagnóstico histopatológico.....	45
4.5 Construção do Microarranjo de Tecido (TMA).....	45
4.6 Imunoistoquímica.....	46
4.7 Classificação imunoistoquímica das amostras.....	48
4.8 Exame toxicológico.....	48
4.9 Ensaio Cometa.....	49
4.10 Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Associação entre resíduos de piretróides em mama e no tecido adiposo e a agressividade dos carcinomas mamários de cadelas.....	53

5.2	Associação entre a intensidade de dano no DNA, resíduos de piretróides e agressividade dos carcinomas mamários de cadelas e resíduos de piretróides.....	58
6.	DISCUSSÃO.....	60
6.1	Associação entre resíduos de piretróides em mama e no tecido adiposo e a agressividade dos carcinomas mamários de cadelas.....	61
6.2	Associação entre a intensidade de dano no DNA, resíduos de piretróides e agressividade dos carcinomas mamários de cadelas.....	64
7.	CONCLUSÕES.....	67
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
9.	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS.....	81
	ARTIGO CIENTÍFICO	

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes e fontes utilizados nas reações imunoistoquímicas.....	47
TABELA 2 Classificação da intensidade de marcação de HER-2 de acordo com o Hercep Test®	47
TABELA 3 Frequências de resíduos de piretróides na mama normal (Grupo Controle) e nos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.....	56
TABELA 4 Frequências de resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente a mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.....	56
TABELA 5 Quantificação (em µg/g) de cada piretróide investigado na mama e no tecido adiposo adjacente à mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Super expressão de HER-2 e Basal) de 50 cadelas.....	57
TABELA 6 Médias e respectivos desvios padrões (s) da intensidade de dano no DNA em células de mama não neoplásicas (Grupo Controle) e células de mama que apresentavam carcinoma (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.....	59
TABELA 7 Médias e seus respectivos desvios padrões (s) da intensidade de dano no DNA em células de carcinoma de mama de cadelas expostas e não expostas aos piretróides.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Imunoexpressão de receptor de estrógeno- α em carcinoma de mama de cadela. a) Ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); b) Marcação nuclear nas células neoplásicas (imunorreatividade em mais de 10% das células neoplásicas; reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).....	53
FIGURA 2 Imunoexpressão de p63 em carcinomas de mama de cadelas. a) Ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); b) Marcação nuclear positiva nas células neoplásicas (reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).....	54
FIGURA 3 Imunoexpressão de HER-2 em carcinomas mamários de cadelas. a) ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); b) marcação positiva 3+ (acentuadamente positiva; marcação completa de membrana; reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).....	55
FIGURA 4 Identificação de cada piretróide investigado na mama e no tecido adiposo adjacente à mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.....	57
FIGURA 5 Fotomicrografias de células neoplásicas de mama de cadelas submetidas ao Ensaio Cometa. Extensão da migração do DNA (cauda). a) Sem cauda, e com tamanhos diferentes de cauda (b, c, d). <i>Syber Green</i> , microscopia de fluorescência, 40x.....	58

Resumo

RESUMO

Dos tumores diagnosticados nas cadelas as neoplasias mamárias apresentam a maior incidência. Essas neoplasias podem ser influenciadas por fatores internos e externos como os contaminantes ambientais. Apesar das evidências da toxicidade dos piretróides, seu potencial cancerígeno ainda não foi suficientemente esclarecido, havendo a necessidade de investigação de sua participação no câncer de mama. Este estudo teve por objetivo investigar possíveis relações entre resíduos de piretróides e carcinoma de mama espontâneo de cadelas correlacionando-os com o grau de agressividade da neoplasia. Foram selecionadas 50 cadelas divididas em cinco grupos com 10 animais cada. O Grupo Controle foi formado por cadelas que apresentavam diagnóstico negativo para neoplasia em mama; os grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal foram formados por cadelas que apresentaram carcinoma em mama classificado pela imunoistoquímica como Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal, respectivamente. O grau de agressividade dos carcinomas foi avaliado por imunoistoquímica mediante a expressão de HER-2, p63 e receptor de Estrógeno. A determinação da concentração de resíduos piretróides aletrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina da mama e do tecido adiposo adjacente à mama foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A intensidade de dano no DNA foi avaliada pelo Teste do Cometa. Das 50 cadelas, seis apresentaram resíduos de um ou mais piretróides nas amostras das mamas avaliadas e 10 apresentaram resíduos desse inseticida nas amostras de tecido adiposo. O piretróide mais frequente foi a deltametrina. A distribuição de cada resíduo investigado entre os grupos avaliados e entre as amostras de mama e de tecido adiposo em um mesmo animal foi heterogênea. Não há evidência estatística de que os piretróides estejam envolvidos na agressividade dos carcinomas de mama das cadelas. A intensidade de dano no DNA das células de mama sem carcinoma foi semelhante à intensidade de dano no DNA das células com carcinoma Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal e os danos não estão relacionados à exposição dessas células aos resíduos de piretróides.

Abstract

ABSTRACT

From all tumors that are diagnosed in female dog, the mammary neoplasia is the one that has the highest incidence. This sort of neoplasia may be influenced by both internal and external factors. Good examples of external factors are the environment contaminants. In spite of knowing the evidences of pyrethroid toxicity, it is not sufficiently clarified yet its cancer potential, thus leaving room for further investigation regarding its participation in the mammary tumor formation. This study aims at investigating not only the possible relationships between pyrethroid residue and spontaneous mammary carcinoma in female dog, but also correlating the degree of aggressiveness of such neoplasia. 50 female dog were selected and divided into five groups containing 10 animals each. Control group contained female dog that presented negative results for mammary neoplasia; female dog that presented mammary carcinoma and were immunohistochemically diagnosed as Luminal A, Luminal B, HER-2 Super-expression and Basal, were divided into groups bearing their respective tumor name. Carcinoma aggressiveness degree was immunohistochemically assessed concerning its expression of HER-2, p63 and Estrogen receptor. In order to define pyrethroid residue concentration for alethrin, cypermethrin, deltamethrin, and tetramethrin on mammary and mammary adjacent adipose tissue it was performed High-Performance Liquid Chromatography. The intensity of DNA damage was assessed via Comet Assay. From the 50 female dog, six have presented residue of one or more pyrethroids in mammary samples, and 10 presented residue of this insecticide in adipose tissue samples. The most frequently found pyrethroid residue was deltamethrin. Residue distribution among groups, and both mammary and adipose tissue of the same individual presented heterogeneous results. There is no statistical evidence showing that pyrethroids may be involved in the aggressiveness of mammary carcinoma in female dog. DNA damage intensity in mammary cells that had no carcinoma was similar to the DNA damage intensity in cells that presented Luminal A, Luminal B, HER-2 super-expression and Basal carcinomas. Such damage is not correlated to the cell exposure to pyrethroid residues.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas, a população mundial que era de 5,7 bilhões em 1995, chegou a 6,8 bilhões em 2010 e deve atingir aproximadamente 9,1 bilhões até a metade do século XXI (ONU, 2011). Para atender as necessidades crescentes por alimentos, provocadas pelo aumento contínuo da população, é importante que haja um sistema complexo e renovável de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas (GAP, 2010). O rendimento maior em cada uma dessas etapas, e o controle de vetores de diversas doenças, tem sido obtido, entre outros fatores, com o emprego de diferentes praguicidas (NUNES e TAJARA, 1998).

Até os primeiros quarenta e cinco anos do século XX foram largamente utilizados os produtos como o piretro, rotenona e nicotina, todos praguicidas biológicos. Após a Segunda Guerra Mundial, as estratégias de crescimento das empresas químicas buscaram a diversificação para novos mercados nos quais pudessem aproveitar as moléculas desenvolvidas para fins bélicos. Foram criadas então, empresas-subsidiárias, oriundas principalmente de grandes grupos químicos, voltadas à produção de praguicidas sintéticos, tendo seu emprego se expandido progressivamente a partir deste momento (BULL e HATHAWAY, 1986).

No Brasil, o uso de praguicidas sintéticos disseminou-se a partir da década de 60, quando o chamado Plano Nacional do Desenvolvimento (PND), adotado pelo governo federal, obrigou os agricultores a comprar uma cota definida destes produtos para que pudessem obter crédito rural. Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes e à expansão da agricultura comercial de exportação, incrementou, de modo exponencial, a utilização de praguicidas sintéticos em nosso País e contribuiu para a quase extinção de outras práticas naturais de manejo de pragas (FERRARI, 1985; GEHLEN, 2004). Assim, entre os anos de 2000 e 2008, as vendas de praguicidas cresceram em torno de 46% no mundo, mas no Brasil esse aumento foi de 176%. A partir de 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de praguicidas. Em 2009, foram vendidas no mercado brasileiro 780

mil toneladas destes produtos, ou seja, aproximadamente 4 quilos por habitante (ANVISA, 2011).

A utilização de praguicidas, se por um lado gera crescimento econômico, por outro trás riscos potenciais ao ambiente e à saúde do homem e de outros animais (RITTER, 1997). Entre esses riscos, se incluem efeitos prejudiciais associados ao uso massivo dos praguicidas inseticidas, substâncias químicas que têm por finalidade controlar ou eliminar insetos presentes não somente em áreas agrícolas, mas também domésticas, veterinárias e de saúde pública (ELLIOTT et al., 1978; BARLOW et al., 2001; ANADÓN et al., 2009).

Cada vez mais casos de pessoas, cães e outros animais contaminados diretamente por inseticidas no meio rural são relatados. No entanto, aqueles que vivem em áreas próximas e, eventualmente, no meio urbano, também se encontram sob risco, devido à contaminação da água pelos inseticidas ou da ingestão de seus resíduos em alimentos, bem como por exposição dérmica após aplicações tópicas, domésticas ou em ambientes públicos ou, inadvertidamente, por inalação durante a aplicação de aerossol. Desta forma, os riscos à saúde associados à aplicação e à exposição aos inseticidas são quase sempre de natureza crônica (RITTER, 1997).

Em termos populacionais, os efeitos crônicos podem ser tão prejudiciais quanto os agudos e têm sido objeto de grande interesse científico, uma vez que existem sugestões fortemente apoiadas por evidências que apontam consequências deletérias na reprodução, na etiologia de danos neurológicos e possivelmente, no aumento da suscetibilidade ao câncer (SHARP et al., 1986; NUNES e TAJARA, 1998; SNEDEKER, 2001; MATOS et al., 2002; ALAVANJA et al., 2004).

Estudos sobre o potencial carcinogênico dos inseticidas piretróides não são conclusivos. Alguns dados epidemiológicos indicam que estes compostos parecem não atuar na carcinogênese do homem (ALAVANJA et al., 2004; LEE et al., 2007; ANDREOTTI et al., 2009; DENNIS et al., 2010). No entanto, outros levantamentos mostram que existem evidências suficientes para se avaliar, com maior cuidado, a participação desses compostos na etiologia de diferentes

tipos de câncer dos humanos (BROWN et al., 1990; ALAVANJA et al., 2003; RUSIECKI et al., 2009), bem como dos caninos, já que ambas as espécies podem compartilhar o mesmo ambiente e portanto, às mesmas condições de exposição (DAGLI, 2008; ANDRADE et al., 2010).

Em relação ao câncer de mama não é diferente. Os resultados de alguns estudos publicados por PARKER et al. (1984a), ENGEL et al. (2005), ANDRADE et al. (2010) e BARIANI e ROCHA (2010) procurando relações entre este câncer e os piretróides mostram-se contraditórios e, portanto, evidenciam a necessidade de mais pesquisas a fim de verificar a influência destes inseticidas na gênese dos carcinomas de mama das mulheres e das cadelas.

Na atualidade, os piretróides são amplamente utilizados na área agrícola e florestal, em domicílios, ambientes públicos, nos programas de saúde pública e no controle de vetores e ectoparasitas dos animais, inclusive do homem (BARLOW et al., 2001). Nos cães, os piretróides são usados extensivamente contra uma ampla gama de ectoparasitas, em diferentes formulações, incluindo *pour-on*, *spray*, coleiras, soluções, xampus e aerossóis (ANADÓN et al., 2009).

Dessa forma, ao se considerar a dimensão e diversidade do uso, bem como dos grupos expostos, as informações sobre a influência dos piretróides na carcinogênese, especialmente no câncer de mama, se fazem necessárias. Em vista disso, procurou-se investigar se os resíduos de piretróides estão envolvidos na agressividade dos carcinomas de mama espontâneos das cadelas.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piretróides: propriedades físico-químicas

As piretrinas são inseticidas naturais, extraídos das flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e resultam da esterificação de um ácido (crisantêmico ou pirétrico) e um álcool (piretrolona, cinerolona, e jasmolona) (ELLIOTT et al., 1978). Os ésteres do ácido crisantêmico são chamados de piretrina I, cinerina I e jasmolina I e os ésteres do ácido pirétrico são chamados de piretrina II, cinerina II, e jasmolina II, respectivamente (CASIDA, 1980; SODERLUND et al., 2002). Ambos os ácidos geram isômeros geométricos *cis/trans*, isto é, substâncias com a mesma fórmula molecular, mas com potencial de ação diferente (CASIDA, 1980).

Por serem considerados inseticidas que apresentam baixa toxicidade aguda para aves e mamíferos e efetivos em baixas doses contra um largo espectro de insetos, as piretrinas foram amplamente empregadas tanto nos países que cultivavam as plantas fornecedoras como por outros que a importavam (CASIDA, 1980). No entanto, devido a sua baixa estabilidade térmica (GOLDBERG et al., 1965) e por se decomporem rapidamente pela radiação solar ultravioleta (BULLIVANT e PATTENDEN, 1976), a busca por análogos das piretrinas se fez necessária e impulsionou modificações estruturais à sua molécula levando a síntese dos piretróides (ZITO et al., 1983).

Os piretróides sintéticos, ativamente produzidos desde a década de 70 (LAUTRAITE e SARGENT, 2009), são divididos em 2 categorias distintas: piretróides do Tipo I e piretróides do Tipo II. Os piretróides do Tipo I, como a aletrina, fenotrina (ou sumitrina), metoflutrín, permetrina, tetrametrina e a resmetrina, não recebem um grupo ciano no carbono alfa da fração fenoxibenzil da molécula destes praguicidas. Em geral, os piretróides do Tipo II como a cialotrina, cipermetrina, deltametrina e o fenvalerato são inseticidas mais potentes em relação aos do Tipo I devido à presença do grupo ciano em sua estrutura (ELLIOT et al., 1978; GLICKMAN e CASIDA, 1982; SODERLUND et al., 2002).

2.2 Piretróides: toxicocinética e tecidos alvo

Em mamíferos, os piretróides são absorvidos rapidamente pelo sistema digestório após a ingestão oral e pelo sistema respiratório via inalação, no entanto, são pouco absorvidos através da pele intacta (CASIDA, 1980; KÜHN et al., 1999; SODERLUND et al., 2002). A absorção gastrointestinal estimada em ratos é de 60,69% para a permetrina (ANADÓN et al., 1991), de 75% para a deltametrina (LAUTRAITE e SARGENT, 2009), e de 96% para a fenotrina (KANEKO et al., 1981), enquanto que entre 15 e 22% da dose de fenotrina (KANEKO et al., 1981) e somente 1% da cipermetrina (SCOTT e RAMSEY, 1987) são absorvidas via derme.

O caráter lipofílico dos piretróides favorece o rápido acesso desses compostos a vários tecidos dos mamíferos. Existe variação na distribuição tecidual desses inseticidas. Este comportamento foi comprovado pelo estudo do balanço e retenção de cipermetrina nos tecidos de ratos que receberam doses orais do inseticida associado ao marcador carbono-14. Vinte e quatro horas após a administração única, os animais que receberam o composto em doses que variaram de 1 a 5 mg.kg⁻¹ apresentaram radioatividade residual, em ordem decrescente, no tecido adiposo, fígado, rim, sangue, músculo e cérebro, variando de 1-2 µg.g⁻¹ no tecido adiposo a 0,005-0,024 µg.g⁻¹ no cérebro (CRAWFORD et al., 1981).

Os piretróides são excretados na urina e bile devido à clivagem hidrolítica da ligação éster do composto original, que fragmenta a molécula em uma porção ácida e outra alcoólica, com oxidação e conjugação subsequente com a glicina ou com o ácido glicurônico, através do sistema enzimático citocromo P450 tornando os metabólitos polares (CASIDA, 1980; KÜHN et al., 1999; SODERLUND et al., 2002). Geralmente mais de 90% da dose é excretada no período médio de uma semana após a exposição (SODERLUND et al., 2002), com exceção do tecido adiposo no qual resíduos podem ser detectados até 30 a 42 dias após (CRAWFORD et al., 1981; APPEL e GERICKE, 1993). A excreção dos piretróides do Tipo I é mais rápida do que os do Tipo II (KANEKO et al., 1981) e o isômero *trans* é mais suscetível à clivagem que o isômero *cis* (CRAWFORD et al., 1981; RHODES et al., 1984).

2.3 Efeitos toxicológicos agudos dos piretróides

Efeitos dérmicos, gastrintestinais, cardiovasculares e principalmente neurofisiológicos, são associados com a intoxicação aguda no homem, em animais de experimentação e em animais de estimação como os cães (HE et al., 1989; CHEN et al., 1991; MURPHY et al., 1999; BARLOW et al., 2001; SODERLUND et al., 2002; LAUTRAITE e SARGENT, 2009; ANADÓN et al., 2009). Em geral, os sinais e sintomas agudos iniciam, em todas as espécies de animais, dentro de minutos até 72 horas de exposição, dependendo da via exposta, e geralmente duram 2 ou 3 dias (TUCKER et al., 1984; ANADÓN et al., 2009).

2.4 Efeitos toxicológicos subcrônicos e crônicos dos piretróides

Em estudos da toxicidade subcrônica dos piretróides, os efeitos observados, após inalação de fevalerato a 20% quatro horas por dia, cinco dias por semana, durante três meses, foram aumento sérico das enzimas fosfatases e transaminases, hepatomegalia e degeneração gordurosa centrolobulares no fígado de ratos *Wistar* adultos de ambos os sexos (MANI et al., 2004). Enquanto que, após ingestão do mesmo composto em concentrações acima de 30 e 150 ppm, durante seis meses, por ratos *Wistar* e camundongos ddY, respectivamente, foram observados microgranulomas multifocais no fígado, baço e linfonodos (OKUNO et al., 1986). Nestes mesmos órgãos também foram encontrados microgranulomas multifocais em camundongos C57Bl/6 que receberam o composto na dose de 20 a 160 mg.kg⁻¹, via inoculação intragástrica, cinco dias na semana, durante 10 semanas (CABRAL e GALENDO, 1990). A incidência e a gravidade dos microgranulomas hepáticos multifocais aumentaram de forma dose-dependente em cães da raça Beagle, machos e fêmeas, alimentados durante seis meses com dietas contendo 250, 500 ou 1000 ppm de fenvalerato. Além disso, independente da dose foram observados vômitos, movimentos de balançar de cabeça, mordedura de extremidades, ataxia e tremores, e os cães que receberam as maiores concentrações do inseticida apresentaram histiocitose em linfonodos mesentéricos, tortuosidade aumentada dos vasos da retina,

hipercolesterolemia e aumento nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (PARKER et al., 1984b).

Dentre os efeitos tóxicos crônicos dos piretróides, os microgranulomas multifocais no fígado, baço e linfonodos também foram encontrados em camundongos B6C3F1 (PARKER et al., 1983) e C57Bl/6 (CABRAL e GALENDO, 1990) de ambos os sexos, que receberam fenvalerato, nas doses de 1250 ppm, via oral, e 40 ou 80 mg.kg⁻¹, via intragástrica, respectivamente, cinco vezes por semana, durante dois anos. As observações clínicas e bioquímicas relacionadas à dose de 1250 ppm consistiram em perda de peso, mortalidade alta, hipoalbuminemia e elevação sérica da enzima aspartato aminotransferase. Adicionalmente, houve aumento de peso do fígado, hipertrofia hepática centrolobular, proliferação do retículo endoplasmático liso e atividade microssomal aumentada em ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* machos que receberam 2500 ppm de permetrina, por via oral, durante dois anos. Neste estudo, os camundongos machos apresentaram uma maior incidência de adenomas pulmonares em relação as fêmeas e ao grupo não tratado com permetrina, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (ISHMAEL e LITCHFIELD, 1988).

Outras neoplasias associadas aos resíduos de piretróides também foram relatadas em ratos, camundongos, em cães e no homem e são apresentadas a seguir.

2.5 Piretróides e o câncer

2.5.1 Câncer e carcinogênese

O termo “câncer” designa neoplasia maligna, ou seja, que já possui a capacidade de invadir os tecidos adjacentes e gerar metástases em órgãos distantes. Porém, a definição mais utilizada para neoplasia é a do médico oncologista britânico Rupert Allan Willis, que em 1952 definiu: “Neoplasia é uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede e é descoordenado em relação ao tecido normal, e persiste [em seu crescimento] da mesma maneira excessiva mesmo após a interrupção dos estímulos que levaram a sua

formação” (WILLIS, 1952). O processo pelo qual o câncer se desenvolve é denominado de carcinogênese.

Evidências demonstram que a carcinogênese no homem e possivelmente em outras espécies animais como os cães, é um processo que evolui em múltiplas etapas e refletem alterações genéticas e epigenéticas que direcionam a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos. Estes eventos, genéticos ou não, recaem sobre seis grandes tipos de alterações que as células cancerosas podem apresentar, todos eles interligados, devendo, ser entendidos de uma forma conjunta: aquisição de sinalização proliferativa autônoma; insensibilidade aos fatores inibitórios do crescimento; evasão da apoptose; neoangiogênese; potencial ilimitado de replicação; invasão tecidual e metastatização (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). Devem-se ainda considerar as alterações que levem à geração de instabilidade cromossômica, potencialmente facilitando a ocorrência do acúmulo das alterações descritas (YAMASAKI e MIRONOV, 2000). A carcinogênese, além de ser caracterizada como um processo de múltiplas etapas, pode ser dividida experimentalmente em três fases: iniciação, promoção e progressão.

A iniciação é rápida e irreversível. Requer a lesão do ácido desoxirribonucléico (DNA) e posterior “fixação” desta alteração por pelo menos um ciclo de proliferação. Os danos ao DNA são comuns, mas a maioria das células danificadas pode reparar seus danos ou então resultar na morte celular (fenômeno da apoptose), portanto, a iniciação é caracterizada por erros irreparáveis. Assim, todo iniciador da carcinogênese é um agente genotóxico, embora nem todas as substâncias genotóxicas iniciem o processo de carcinogênese (OLIVEIRA et al., 2007).

A promoção, por sua vez, é a etapa em que ocorre o crescimento clonal das células iniciadas e, conseqüentemente, a expressão dos danos ao genoma ocorridos na iniciação (DIGIOVANNI, 1992). O promotor, sendo um agente químico ou físico, geralmente age por estímulo à proliferação celular, comumente por mecanismos primariamente epigenéticos, isto é, não agredem o DNA. Se a exposição aos promotores for interrompida antes do aparecimento

de tumores, as alterações estabelecidas por eles, por exemplo, hiperplasias, regridem, ou seja, são reversíveis (YUSPA et al., 1976).

Finalmente, na etapa da progressão, a lesão pré-neoplásica continua a crescer mesmo na ausência do agente promotor e as células tumorais podem ou não adquirir as características básicas da malignidade, como aneuploidia e capacidade de invasão tecidual e de metástases. Nesta fase se localizam as lesões benignas (adenomas, por exemplo), assim como as malignas (adenocarcinomas) (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Em relação a esse aspecto, em um ensaio de iniciação-promoção da carcinogênese *in vivo*, SHUKLA et al. (2001) demonstraram o papel iniciador do piretróide deltametrina na pele de camundongos *Swiss* albino, em 44% dos machos e 43% das fêmeas, quando aplicada em dose tópica única de 4 mg.kg⁻¹, e em 71% dos machos e 75% das fêmeas quando aplicada em múltiplas doses sucessivas (4 mg.kg⁻¹, três aplicações por semana, durante três semanas), utilizando-se como agente promotor o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), a substância ativa do óleo de cróton. No entanto, nas mesmas doses da indução, a deltametrina não apresentou atividade promotora nos tumores cutâneos dos camundongos iniciados com 7,12-dimetilbenzeno antraceno (DMBA).

Em outro estudo, SHUKLA et al. (2002) demonstraram, através de uma ou multiplas aplicações tópicas (10mg.kg⁻¹), que o piretróide cipermetrina atuou tanto como agente iniciador em mais de 70% dos camundongos *Swiss* albino machos e fêmeas testados quando o TPA foi utilizado como promotor, quanto como agente promotor em aproximadamente 40% dos animais, de ambos os sexos, quando o DMBA foi utilizado como iniciador. Adicionalmente, a cipermetrina revelou ser um cancerígeno completo em 13, 26 e 35% dos animais, quando utilizada nas respectivas doses de 5, 10 e 25 mg.kg⁻¹, três aplicações por semana, durante 52 semanas.

Sendo assim, os piretróides podem estar envolvidos na carcinogênese por mais de um mecanismo.

2.5.2 Possíveis mecanismos envolvidos na carcinogênese por piretróides

Um mecanismo pelo qual os piretróides podem atuar na carcinogênese envolve danos genéticos, uma vez que a genotoxicidade do piretróide permetrina foi detectada tanto *in vitro*, em cultura de células da mucosa nasal de humanos (TISCH et al., 2002), quanto *in vivo*, em linfócitos de rato *Wistar* (GABBIANELLI et al., 2004; GABBIANELLI et al., 2009), avaliados pelo Ensaio Cometa. Os efeitos foram influenciados pela dose e duração da exposição, pois um período mais longo de exposição à permetrina causou mais danos ao DNA do que uma dose mais elevada por um curto tempo provavelmente devido ao caráter hidrofóbico dos piretróides, que limita a sua rápida difusão celular (GABBIANELLI et al., 2004). Esses danos foram relacionados a espécies reativas de oxigênio produzido pelos piretróides (KALE et al., 1999; GABBIANELLI et al., 2004; GABBIANELLI et al., 2009), que podem peroxidar lipídeos da membrana e oxidar as proteínas celulares, incluindo o DNA (GUYTON e KENSLER, 1993). Adicionalmente, CHAUHAN et al. (2007) observaram, em linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos, que a deltametrina induziu aberrações cromossômicas e micronúcleos.

Outro mecanismo proposto para a carcinogênese induzida pelos piretróides em ratos tem relação com os genes metabolizadores de xenobióticos, membros da família do citocromo P450 (CYP). Por exemplo, DEGUCHI et al. (2009) estudando o hepatócitos de ratos *Wistar*, de ambos os sexos, com tumores hepáticos induzidos pelo piretróide metoflutrin, em doses repetidas de 900 ou 1800 ppm, por via oral, observaram que, de forma semelhante ao verificado para o fenobarbital, ocorre ativação transcricional dos genes codificantes de dois membros da isoforma CYP2B, os genes *CYP2B1* e *CYP2B2*. Como consequência, ocorre aumento da atividade catalítica da enzima CYP o que resulta em hipertrofia ou proliferação do retículo endoplasmático liso, atividade microssomal aumentada, ativação do receptor constitutivo de androstano (*constitutive androstane receptor* - CAR) e hipertrofia e proliferação dos hepatócitos centrolobulares (HIROSE et al., 2009). Esta

resposta presumivelmente é a responsável pela promoção de hepatócitos iniciados (OLIVEIRA et al., 2007).

Ainda, foi proposto que a carcinogenicidade das permetrinas em camundongos implica no aumento da atividade da triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) ou indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), enzimas responsáveis pela quebra do triptofano (EL-TOUKHY et al., 1989). O triptofano é um aminoácido essencial, que além de fazer parte de proteínas, é um precursor de compostos bioativos. Estes compostos são formados em duas rotas ou vias metabólicas específicas: via serotoninérgica e via das quinureninas. A via serotoninérgica converte o triptofano no neurotransmissor serotonina. Na via das quinureninas, o triptofano é oxidado à N-formil-quinurenina que é subsequentemente deformilada e transformada em L-quinurenina. A partir deste último, uma série de compostos são formados como, por exemplo, 3-hidroxi-quinurenina e o ácido quinolítico. O metabolismo do triptofano nesta via é mediado por duas enzimas diferentes: TDO e IDO (STONE, 2001). Aumento da atividade dessas enzimas acarreta em alteração no metabolismo do triptofano através do qual substâncias endógenas oxidantes são formadas (EL-TOUKHY et al., 1989).

Outra hipótese proposta para explicar a atuação dos piretróides na modulação do câncer envolve a desregulação endócrina provocada por esses compostos (GO et al., 1999; EJAZ et al., 2004). Por exemplo, estudos *in vitro* realizados por GO et al., (1999), mostram que alguns piretróides possuem efeito sobre o crescimento das células de câncer de mama humana estrógeno-dependente da linhagem MCF-7. Em concentrações semelhantes às relatadas para estrógeno no plasma humano (10 μ M), o piretróide fenotrina induziu a expressão do gene pS2 (responsivo ao estrógeno), bem como estimulou a proliferação celular, indicando que o mecanismo de ação da fenotrina ocorre via interação com o receptor estrogênico. Da mesma forma, o piretróide fenvalerato foi capaz de induzir a expressão do gene pS2 até mesmo em doses baixas (500 nM), no entanto, exposições semelhantes à simutrina (10 μ M) foram necessárias para causar proliferação celular. Em contraste, o piretróide aletrina (10 μ M) comportou-se como um inibidor moderado da expressão de pS2, mas induziu a proliferação celular e foram necessários 100 μ M do piretróide permetrina para as células MCF-7 exibirem apenas aumentos

modestos na expressão de pS2 e proliferarem. Além disso, a indução da expressão de pS2 pela fenotrina e fenvalerato foi bloqueada pelo anti estrogênico ICI 164,384.

Além disso, há evidências de que os piretróides poderiam agir na carcinogênese pela ação inibitória das junções comunicantes intercelulares do tipo GAP em fibroblastos Balb/c3T3 (TATENO et al., 1993) e em hepatócitos de ratos *Wistar* (DEGUCHI et al., 2009). As junções comunicantes intercelulares são canais presentes nas membranas das células que permitem o movimento intercitoplasmático de íons inorgânicos entre células vizinhas, sem passar pelo espaço intercelular (BRUZZONE et al., 1996). Como a restrição ao crescimento imposta por células normais sobre células iniciadas no processo de transformação maligna pode ser resultado da transmissão de fatores químicos reguladores de divisão e diferenciação, o bloqueio na comunicação intercelular provavelmente libera células iniciadas para uma proliferação desordenada (YAMASAKI, 1990).

2.5.3 Carcinogenicidade experimental dos piretróides

Alguns estudos controlados foram realizados procurando investigar se os piretróides apresentam potencial carcinogênico, mas os resultados ainda se mostram contraditórios.

O potencial cancerígeno do piretróide fenvalerato foi avaliado em camundongos das linhagens B6C3F1 (PARKER et al., 1983) e C57BL/6 (CABRAL e GALENDO, 1990) de ambos os sexos, que receberam o inseticida nas doses de 10, 50, 250 ou 1250 ppm, por via oral, e 40 ou 80 mg.kg⁻¹, via intragástrica, respectivamente, cinco vezes por semana, durante dois anos. Não foram observadas neoplasias relacionadas às doses de 10-1250 ppm. Nos camundongos machos, mas não nas fêmeas, que receberam 80 mg.kg⁻¹, houve um aumento na incidência de tumores hepáticos em relação ao grupo controle que não foi tratado com fenvalerato. No entanto, em experimento paralelo, CABRAL e GALENDO (1990) observaram que as fêmeas de camundongos SJL/ola que receberam fenvalerato a 92% na dose de 80 mg.kg⁻¹, uma vez por semana, durante 12 semanas, desenvolveram linfoma

antes das fêmeas que receberam a mesma dose de fenvalerato a 99% de pureza, indicando que as substâncias impuras presentes nas formulações dos piretróides provavelmente estejam envolvidas no desenvolvimento das neoplasias.

Aumentos significativos na incidência de linfomas também foram observados em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas que receberam deltametrina, por via intragástrica, nas doses de 1 ou 4 mg.kg⁻¹, cinco dias por semana, durante dois anos. Apesar dos ratos BDVI, submetidos a condições experimentais semelhantes, não terem desenvolvido linfomas, houve aumento na incidência de adenomas de tireóide quando receberam a deltametrina, por via intragástrica, na dose de 3 mg.kg⁻¹ (machos) e 6 mg.kg⁻¹ (fêmeas) (CABRAL et al., 1990). Em contraste, não foi observada evidência de neoplasia em ratos *Wistar* tratados com 500, 1000 ou 2500 ppm de permetrina, por via oral, durante dois anos e apesar de camundongos *Swiss* machos que receberam a dose de 2500 ppm terem apresentado uma maior incidência de adenomas pulmonares em relação as fêmeas e ao grupo não tratado com permetrina o aumento não foi significativo (ISHMAEL e LITCHFIELD, 1988).

A carcinogenicidade do piretróide metoflutrín, foi avaliada em ratos HanBrl:WIST e camundongos CD-1, de ambos os sexos. Tanto os ratos machos quanto as fêmeas foram alimentados com zero (controle não tratado) 20, 200, 900, ou 1800 ppm de metoflutrín, por via oral, durante dois anos. A incidência combinada de adenomas e carcinomas hepáticos nos grupos zero, 20, 200, 900 e 1800 ppm foi, respectivamente, 2, 2, 6, 16 e 24% para os machos e 2, 6, 2, 10 e 24% para as fêmeas, ou seja, a incidência de adenomas e/ou carcinomas hepáticos foi significativamente maior nos machos que receberam 900 ou 1.800 ppm e em fêmeas que receberam 1800 ppm, em relação ao grupo não tratado com metoflutrín. Os camundongos machos e fêmeas que receberam 100, 1000, 1750 ou 2500 ppm de metoflutrín, por via oral, durante dois anos, não apresentaram neoplasias hepáticas ou em qualquer outro tecido (DEGUCHI et al., 2009).

2.5.4 Dados epidemiológicos

Do ponto de vista epidemiológico, os riscos dos piretróides estarem envolvidos na carcinogênese foram avaliados através de estudos coorte e caso-controle.

Nos Estados Unidos para investigar os efeitos crônicos de exposição a praguicidas, especialmente o risco de câncer, foi gerado um grande banco de dados, o Estudo de Saúde Agrícola (*Agricultural Health Study* - AHS). A AHS é um estudo coorte prospectivo, em andamento, que iniciou em 1993 e envolve 89.658 indivíduos, cadastrados entre 1993 e 1997, licenciados para aplicar praguicidas (agricultores e aplicadores comerciais), bem como seus cônjuges, residentes nos estados de Iowa e Carolina do Norte, onde muitas cidades rurais e vilas são circundadas por culturas. Através de questionários aplicados no momento da inscrição e reaplicados periodicamente, importantes dados de exposição a praguicidas e desenvolvimento de câncer são monitorados.

Em 2009, RUSIECKI et al., publicaram os resultados de um segmento desse grande banco de dados. Eles avaliaram se o risco de câncer estava relacionado à exposição à permetrina entre os anos de 1993 e 2004. Para tal, 49.093 aplicadores de praguicidas, inscritos na coorte AHS, foram divididos em três grupos: não expostos, baixa exposição e alta exposição à permetrina. Dentre todos os tipos de câncer avaliados, tanto de tecidos sólidos (câncer de cólon, reto, pulmão, próstata, bexiga e melanoma) quanto do sistema linfático (leucemias; mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin), a única associação significativa foi observada com mieloma múltiplo que apresentou um comportamento dose-resposta importante. O risco de mieloma múltiplo foi 4,76 vezes superior em aplicadores mais expostos para o número de dias de exposição do que os menos expostos e subiu para 5,72 vezes quando comparados com os aplicadores de praguicidas que nunca haviam sido expostos à permetrina. Um aumento semelhante no risco foi observado também em indivíduos que, para a intensidade de exposição, foram mais expostos em comparação com aqueles menos expostos (risco 5,32 vezes) ou com aqueles nunca expostos ao inseticida permetrina (risco 5,01 vezes). Devido ao número de casos incidentes de mieloma (44 casos) ser pequeno, não foi excluída a hipótese desta associação ocorrer devido ao acaso.

Em outro estudo prospectivo, nesta mesma coorte, ALAVANJA et al. (2003), avaliaram a relação entre 45 praguicidas específicos das classes inseticida, herbicida, fungicida e fumigantes e o câncer de próstata em 55.332 aplicadores de praguicidas. Segundo os pesquisadores, entre 1993 e 1999, a incidência do câncer de próstata nesta coorte foi aproximadamente 14% mais alta do que o esperado para a população dos dois Estados selecionados e sete (brometo de metila, clorpirifós, cumafós, forato, butilato e piretrina/piretróides) dos 45 praguicidas avaliados mostraram uma possível relação com os 566 casos diagnosticados de câncer de próstata neste período. Foi observado que, entre aqueles com história familiar de câncer de próstata, os aplicadores expostos aos inseticidas piretrinas/piretróides de uso veterinário apresentaram um risco 2,38 vezes maior de desenvolverem câncer de próstata, comparados com aqueles que não haviam aplicado piretrina/piretróide em animais, embora não houvesse nenhum risco aumentado entre os aplicadores de piretrinas/piretróides sem uma história familiar de câncer de próstata. Não foram encontradas associações entre os inseticidas piretrinas/piretróides utilizados em culturas e o risco de câncer de próstata.

No entanto, em ano posterior, ALAVANJA et al. (2004) publicaram os resultados de um estudo envolvendo 57.284 aplicadores de praguicidas e 32.333 cônjuges inscritos na AHS no qual foi explorada a associação entre a exposição a 50 agrotóxicos e o câncer primário de pulmão. Neste estudo, não foram encontradas associações entre os 300 casos de câncer de pulmão diagnosticados entre 1993 e 2001 e a exposição prolongada as piretrinas/piretróides de emprego agrícola ou pecuário, independente da idade e do hábito de fumar ou não. Resultados semelhantes foram obtidos por LEE et al. (2007) que, apesar de terem observado associação significativas entre dois inseticidas (aldicarb e fonofos) e os riscos elevados de câncer de cólon, e entre dois outros inseticidas (carbaril e toxafeno) e o risco de câncer retal, não encontraram associação entre a exposição prolongada as piretrinas/piretróides utilizadas em animais ou em culturas e os 305 casos de câncer colorretal (212 cólon, 93 reto) diagnosticados no período estudado (1993 a 2002) e investigados em 56.813 membros da coorte AHS.

Em outro estudo, realizado entre 1993 e 2004 na coorte AHS que incluiu 93 casos de câncer de pâncreas incidente (64 aplicadores, 29 cônjuges) e 82.503 controles livre do câncer (52.721 aplicadores e 29.782 cônjuges), ANDREOTTI et al. (2009) também não encontraram associação significativa entre as piretrinas/piretróides e o risco de câncer de pâncreas, mesmo após os pesquisadores eliminarem os outros fatores de risco (tabagismo, obesidade, pancreatite crônica, diabetes, cirrose, etc.). Após o ajuste dos fatores de risco, os pesquisadores identificaram que, dentre 50 agrotóxicos avaliados, apenas os herbicidas pendimetalin e EPTC demonstraram relevante associação com câncer de pâncreas. Da mesma forma, DENNIS et al. (2010) não encontraram associação significativa entre o risco de melanoma cutâneo e a exposição prolongada as piretrinas/piretróides utilizadas em animais ou em culturas ao avaliarem 150 aplicadores de praguicidas que apresentaram melanoma cutâneo e 24.654 aplicadores que não apresentaram melanoma, entre 1993 e 2005 cadastrados na coorte AHS. Apesar da baixa taxa de incidência de melanoma entre os participantes do estudo, foi observado que existe um risco substancial de melanoma entre os trabalhadores com exposição repetida a seis substâncias, entre elas dois fungicidas (benomyl e maneb/mancozeb) e dois inseticidas (carbaril e metil/etil paration).

Um estudo caso-controle foi realizado por BROWN et al. (1990), para avaliar se a exposição a praguicidas está relacionada ao risco de leucemia, em um grupo constituído por 578 homens com leucemia e 1.245 homens sem a doença, residentes nos Estados americanos de Iowa e Minnesotta entre os anos de 1981 e 1984. Os dados foram colhidos através de entrevistas padronizadas, realizadas com os sujeitos ou com parentes próximos, em caso de óbito ou impossibilidade de serem entrevistados. Foi observada uma pequena, mas significativa, elevação no risco de todas as leucemias combinadas (leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica) (risco 1,2 vezes) e para leucemia linfocítica crônica (risco 1,4 vezes) entre indivíduos relacionados a atividades agropecuárias em comparação àqueles com outras atividades. Não foram encontradas associações com compostos fungicidas ou herbicidas agrícolas específicos. No entanto, homens expostos as piretrinas de utilização veterinária

apresentaram um risco 3,7 vezes maior de desenvolver leucemia em comparação aos não expostos as piretrinas.

2.6 Câncer de mama

O câncer de mama espontâneo é a neoplasia mais prevalente na cadela e na mulher (CAMERON e FOSTER, 2009; KLOPFLEISCH et al., 2010). Embora, em ambas as espécies, a ocorrência varie com a idade, geografia e raça ou etnia, a incidência desse câncer é, em geral, de uma em quatro cadelas, não esterilizadas, com idade superior a quatro anos (FANTON e WITHROW, 1981; Mac EWEN e WITHROW, 1996) e uma em nove mulheres com idade entre 50 e 69 anos (CANADIAN, 2009; AUSTRALIAN, 2010). No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama em 2010 foi de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama foi o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos para cada 100 mil (BRASIL, 2009).

Para o diagnóstico e prognóstico do carcinoma (neoplasia epitelial maligna) de mama, utiliza-se a classificação clínica das neoplasias malignas de mama proposta pela União Internacional Contra o Câncer (*Internacional Union Against Cancer* - IUAC). Inicia-se com exame físico completo, palpação da lesão e linfonodos regionais. Os parâmetros considerados são: Categorias T – extensão do tumor primário, Categorias N – ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais; Categorias M – ausência ou presença de metástase à distância. Todos os casos devem ser confirmados microscopicamente.

Os exames microscópicos convencionais para o diagnóstico e prognóstico desse câncer são o citopatológico e o histopatológico (ALLEN et al., 1986; ARAUJO et al., 1999; GRANDI et al., 2010). O diagnóstico microscópico considera o padrão tecidual classificado como ductal, papilar, tubular e sólido e suas características citológicas. O diagnóstico e a classificação dos diferentes tipos de neoplasia são importantes, pois confirmam o TNM clínico (tumor, linfonodo e metástase) e indicam o seu comportamento

biólogo (PEREZ-MARTINZ et al., 2005; LEVINE et al., 2006; GRANDI et al., 2010).

Por outro lado, a técnica do Microarranjo de Tecido (*Tissue MicroArray-TMA*) impulsionou os conhecimentos dos perfis moleculares no prognóstico das neoplasias. Esta técnica resulta na construção de um bloco receptor que contém dezenas ou centenas de fragmentos cilíndricos de amostras tumorais retiradas de blocos originais de parafina. As amostras dos fragmentos extraídos são inseridas em um único bloco receptor (KONONEN et al., 1998; HIDALGO et al., 2003; BERTUCCI et al., 2006). Deste modo, o TMA permite a realização de experimentos nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos, e é uma ferramenta útil para pesquisar, através de reações imunoistoquímicas, receptores hormonais e proteínas relacionadas com os perfis de expressão gênica dos tumores. Com isso torna-se possível distinguir os subtipos tumorais e prever a agressividade de várias neoplasias ao mesmo tempo (BERTUCCI et al., 2006).

O painel imunoistoquímico para caracterizar o prognóstico dos carcinomas mamários na mulher é utilizado na rotina dos laboratórios de patologia humana (VIEIRA et al., 2008). Na classificação imunoistoquímica de PEROU et al. (2000), os carcinomas de mama das mulheres foram subdivididos em Luminal A, Luminal B, Superexpressão do HER-2 e Basal.

O subtipo Luminal A, cujo fenótipo é receptor de estrogênio (RE) positivo e receptor 2 de fator de crescimento epitelial humano (*Human Epidermal growth factor Receptor 2* - HER-2) negativo é caracterizado por apresentar comportamento biológico menos agressivo. O subtipo Luminal B, cujo fenótipo é RE positivo e HER-2 positivo, caracteriza-se por agressividade moderada. O subtipo Superexpressão do HER-2, cujo fenótipo é RE negativo e HER-2 positivo, caracteriza-se pela perda de controle da proliferação celular, conferindo a esses tipos de tumores maior agressividade em relação aos luminais. O subtipo Basal, cujo fenótipo é RE negativo, HER-2 negativo, é caracterizado por maior potencial de agressividade biológica. (SORLIE et al., 2001; SORLIE, 2004; SORLIE et al., 2006). O subtipo Basal ainda expressa as

proteínas p63 e/ou citoqueratina-5 comumente presentes nas células progenitoras ou células basais da mama (MATOS et al., 2005).

Diante dessa classificação, GAMA et al. (2008) e SASSI et al. (2010) testaram o painel imunoistoquímico utilizado na Medicina, em carcinomas mamários de cadelas e concluíram que, semelhante ao câncer de mama da mulher, os carcinomas de mama das cadelas são passíveis de classificação baseada nos marcadores preditivos de agressividade tumoral utilizados na Medicina.

Outro método que já foi utilizado em mulheres para identificar a instabilidade genômica, seu comportamento biológico e consequentemente seu prognóstico e indicação da conduta terapêutica (OLIVE et al., 1993; OLIVE et al., 1996; JOHNSTONE et al., 2000; COLLEU-DUREL et al., 2004) é o Teste da Corrida de Células Únicas em Gel de Eletroforese (*Single Cell Gel Electrophoresis assay* - SCGE) ou Teste do Cometa ou Ensaio Cometa.

As células submetidas ao Ensaio Cometa são incluídas em gel de agarose e dispostas em fina camada sobre lâminas histológicas. Através de soluções apropriadas, as membranas da célula, núcleo e organelas são rompidas. Os componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares são retirados e fragmentos de DNA migram no sentido do ânodo. Quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após coloração, observam-se as preparações ao microscópio, e o DNA danificado de uma célula individual revela-se com forma similar a de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migram. O dano pode ser quantificado em células individuais. Quanto maior for a migração maior será a extensão da lesão genômica (SINGH et al., 1988; WOZNIAK et al., 2007; NOSSONI, 2008; COLLINS et al., 2008).

2.7 Piretróides e o câncer de mama

Além dos fatores etários e raciais, para os cães, como para os seres humanos com os quais esses animais podem viver em estreita associação, o estilo de vida, dieta e fatores ambientais, podem contribuir para o desenvolvimento de alguns casos de câncer de mama (DAGLI, 2008).

Dentre os fatores ambientais, foi estudado o envolvimento dos piretróides no câncer de mama em um ensaio de carcinogenicidade oral, em ratas *Sprague-Dawley*, que receberam 1 a 1000 ppm do piretróide fenvalerato na dieta, durante dois anos. Foi observado aumento significativo na incidência de tumores de mama na ordem de 51%, 57%, 70%, 65% e 55% para as doses de 1, 5, 25, 250 e 1000 ppm, respectivamente, contra 43% no grupo não tratado (PARKER et al., 1984a).

No entanto, em estudo epidemiológico na coorte AHS, foi avaliado o risco de câncer de mama e a exposição indireta, a 50 agrotóxicos específicos entre 30.454 esposas de aplicadores de praguicidas. Não foi observada relação entre os 309 casos incidentes de câncer de mama registrados nos Estados de Iowa e Carolina do Norte entre 1993 e 2000 e a exposição a todos os praguicidas combinados, ou à exposição isolada aos inseticidas piretrinas/piretróides. Entretanto, os pesquisadores ressaltam a necessidade de novos estudos devido ao pequeno número de casos observados ENGEL et al. (2005).

Diante desses dados e devido a inexistência de investigações semelhantes em cães, ANDRADE et al. (2010) e BARIANI e ROCHA (2010) pesquisaram a deposição de piretróides em tecido adiposo adjacente às neoplasias malignas em mama de nove e 30 cadelas, respectivamente. Ao proceder a análise cromatográfica das amostras, foi detectada a presença dos piretróides aletrina, cialotrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina em três (ANDRADE et al., 2010) e 16 (BARIANI e ROCHA, 2010) cadelas portadoras de neoplasias mamárias. Os importantes resultados obtidos por esses pesquisadores, sinalizam para o prosseguimento de estudos com maior detalhamento, a fim de verificar a influência deste inseticida na gênese e agressividade do câncer de mama das cadelas.

Uma vez que as neoplasias mamárias espontâneas dos canídeos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, bioquímicas e biológicas semelhantes àsquelas do homem (DAGLI, 2008; KLOPFLEISCH et al., 2010) e como as espécies compartilham o mesmo ambiente (DAGLI, 2008; ANDRADE et al., 2010), novos e mais aprofundados estudos em cadelas

poderão disponibilizar um modelo comparativo auxiliar na elucidação de vários aspectos da carcinogênese mamária da mulher.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Geral

Identificar possíveis relações entre resíduos de piretróides e carcinoma de mama espontâneo em cadelas correlacionando-os com o grau de agressividade da neoplasia.

Específicos

Identificar e quantificar resíduos de piretróides em amostra de carcinoma de mama e de tecido adiposo adjacente ao carcinoma de mama de cadela pela análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);

Identificar e quantificar resíduos de piretróides em amostra de mama e de tecido adiposo adjacente à mama de cadela sem neoplasia pela análise de HPLC;

Relacionar os resíduos de piretróides com o grau de agressividade dos carcinomas de mama classificados imunoistoquimicamente pela expressão de RE α , HER-2 e p63;

Quantificar as lesões ao DNA de células de carcinoma de mama de cadelas através do Ensaio Cometa e relacioná-las com o grau de agressividade dos carcinomas de mama classificados imunoistoquimicamente pela expressão de RE α , HER-2 e p63;

Relacionar a intensidade de dano no DNA em células de carcinoma de mama de cadelas com a presença de resíduos de piretróides na mama ou no tecido adiposo adjacente ao carcinoma de mama.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Regulamentação do estudo

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, São Paulo, sob protocolo número 42/2009 (Anexo A). A inclusão dos animais foi condicionada à autorização dos proprietários por meio da assinatura de um termo de consentimento, após o esclarecimento sobre o protocolo experimental (Anexo B).

4.2 Seleção dos animais

No Serviço de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e no Serviço de Reprodução Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, foram selecionadas 98 cadelas, com idade entre sete e 12 anos, sem predileção por raça, que apresentavam diagnóstico citopatológico de carcinoma de mama inguinal ou abdominal caudal e 10 cadelas híginas encaminhadas ao programa de esterilização do Serviço de Reprodução Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, que apresentavam diagnóstico clínico negativo para neoplasia em mama. Os dados semiológicos das cadelas selecionadas foram anotados em um formulário para colheita de dados (Anexo C).

4.3 Diagnóstico citopatológico

Após antissepsia do local, as lesões em mama das cadelas com neoplasia foram puncionadas, com agulha descartável 26G 1/2, para caracterizar preliminarmente o aumento de volume como neoplasia maligna de origem mamária. As amostras obtidas foram distendidas em lâminas histológicas, fixadas em metanol p.a. (Merck, Darmstadt, Germany) e coradas em *May-Grünwald Giemsa* para caracterização morfológica e fixadas em etanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany) para coloração pelo método de Papanicolau a fim de avaliar as características de malignidade nuclear. Posteriormente, foram analisadas ao microscópio de luz (ZEISS – I Model AXIO Imager A1). Os

critérios de malignidade citopatológicos foram os preconizados por ALLEN et al. (1986) e adotados pelo Serviço de Patologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP.

4.4 Diagnóstico histopatológico

Para análise anatomohistopatológica foi colhido um fragmento de 1 cm² da massa tumoral das 98 cadelas com neoplasia em mama submetidas à mastectomia parcial ou radical e de uma das mamas inguinais das cadelas sem tumor de mama, durante o procedimento de ovariosalpingohisterectomia eletiva. O fragmento colhido foi fixado em formalina a 10% tamponada, rotineiramente processado para histopatologia e corado com Hematoxilina e Eosina (HE) no Serviço de Patologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP. Nesses cortes foi verificada a qualidade da lâmina, realizada a classificação da neoplasia e foram escolhidos os locais para a coleta dos cilindros posteriormente avaliados por microarranjo de tecido. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz (ZEISS – I Model AXIO Imager A1) seguindo os critérios de classificação tumoral de acordo com a composição celular, adotados pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999).

4.5 Construção do Microarranjo de Tecido (TMA)

A partir dos cortes corados com HE, as áreas de interesse para o estudo imunoistoquímico das amostras foram marcadas nas lâminas e identificadas nos blocos doadores. No Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo/São Paulo/SP, as áreas identificadas nos blocos doadores das 98 cadelas com carcinoma de mama, foram retiradas e transferidas para dois blocos receptores. Para cada caso foram retirados dois cilindros de 2 mm de diâmetro de duas áreas distintas do tumor. Em cada bloco receptor foram incluídas também amostras de mama não neoplásica como controle e uma amostra de tecido placentário normal para orientação do bloco. Para a construção dos TMAs foi utilizado o *Tissue MicroArray Builder 20010.2*, Histopathology Ltd, Hungary. Após a construção, cortes de 3 µm foram cortados e aderidos às lâminas histológicas carregadas positivamente (*Positive charged adhesion slides*, Amitel, Brasil), parafinizadas e armazenadas a -20 °C

até sua utilização nas reações imunoistoquímicas. Um corte de cada bloco receptor foi corado em HE e revisado para confirmar a presença de áreas morfológicas representativas das lesões originais.

4.6 Imunoistoquímica

As amostras contidas nas lâminas de TMA foram submetidas à reação imunoistoquímica seguindo o protocolo padronizado no Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada do Serviço de Patologia da FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, utilizando-se os anticorpos RE α , HER-2 e p63.

Após serem desparafinizadas e reidratadas, as amostras foram submetidas à recuperação antigênica, utilizando Citrato pH 6,0 em Câmara Microprocessada de Pressão Pascal (Dako, EUA) durante 30 segundos a 125 °C. Em seguida, o material foi incubado com Peróxido de Hidrogênio a 3% diluído em Metanol, por 30 minutos em câmara escura, e posteriormente foi lavado com tampão Tris EDTA pH 7,4. Na sequência, as amostras foram incubadas com *Protein Block* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) por 10 minutos, em temperatura ambiente e lavadas com tampão Tris EDTA pH 7,4. Posteriormente foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos em *IHC diluent solution* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) e aplicados sobre os cortes para incubação *overnight* a 4 °C. Para a amplificação de sinal utilizou-se o sistema baseado em polímero *NovoLink* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) e para revelação a solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Dako, Carpinteria, EUA). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem PermOUNT para leitura.

Tabela 1. Anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes e fontes utilizados nas reações imunoistoquímicas

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Fonte
REα	6F11	1:25	Novocastra Laboratories, Inglaterra	Camundongo
HER-2	policlonal	1:2000	Dako, EUA	Coelho
p63	4A4	1:150	Dako, EUA	Camundongo

A leitura das lâminas foi feita em microscópio de luz (ZEISS – I Model AXIO Imager A1) seguindo o mapeamento prévio dos TMAs e para cada marcador foi utilizada uma graduação semiquantitativa para avaliar os resultados da imunoistoquímica.

As marcações de REα foram consideradas positivas quando apresentaram marcação nuclear em mais de 10% das células, conforme o estabelecido por SCHMITT et al. (1995).

Graduações de intensidade de coloração para HER-2 foram estabelecidas através de análise óptica baseando-se no sistema de graduação Hercep Test® (Tabela 2). Os resultados foram considerados positivos quando o tecido foi classificado como 2+ ou 3+.

Tabela 2. Classificação da intensidade de marcação de HER-2, de acordo com o Hercep Test®

ESCORE	NÍVEL DE IMUNOEXPRESSÃO	PADRÃO DE MARCAÇÃO
0	Negativo	Ausência de coloração ou marcação de membrana <10% das células
1+	Negativo	Não há marcação de membrana completa; marcação discretamente perceptível em >10% das células
2+	Discretamente positivo	Marcação de membrana completa discreta a moderada em >10% das células
3+	Acentuadamente positivo	Marcação de membrana completa acentuada em >10% das células

As marcações de p63 foram consideradas positivas quando houve marcação nuclear (BHARGAVA et al., 2010) em mais do que 10% das células neoplásicas.

4.7 Classificação imunoistoquímica das amostras

Com os dados obtidos das reações imunoistoquímicas foram utilizadas amostras de 50 cadelas que foram distribuídas em cinco grupos com 10 animais cada. O Grupo Controle foi formado por cadelas que apresentavam diagnóstico clínico e histopatológico negativo para neoplasia em mama, o Grupo Luminal A foi formado por cadelas que apresentaram carcinoma em mama classificado pela imunoistoquímica como Luminal A (RE positivo, HER-2 negativa e p63 negativa), o Grupo Luminal B foi formado por cadelas que apresentaram carcinoma mamário classificado pela imunoistoquímica como Luminal B (RE positivo, HER-2 positiva e p63 negativa), o Grupo Superexpressão de HER-2 foi formado por cadelas que apresentaram carcinoma em mama classificado pela imunoistoquímica como Superexpressão de HER-2 (RE negativo, HER-2 positiva e p63 negativa), e o Grupo Basal foi formado por cadelas que apresentaram carcinoma em mama classificado pela imunoistoquímica como Basal (RE negativo, HER-2 negativa e p63 positiva). O número de animais por faixa etária foi similar nos cinco grupos e todas as cadelas selecionadas residiam em ambiente urbano, tinham acesso ao interior da residência dos proprietários, eram alimentadas com ração comercial e comida caseira, nunca foram tratadas com hormonioterapia e não haviam sido submetidas a tratamento tópico com piretróides por no mínimo 60 dias.

4.8 Exame toxicológico

Durante o procedimento cirúrgico de mastectomia (cadelas com carcinoma em mama) e ovariosalpingohisterectomia eletiva (cadelas sem tumor de mama) foram colhidos respectivamente, 5g do tecido neoplásico e 5g da mama inguinal normal. Também foram colhidas, de todas as cadelas de todos os grupos, 5g de tecido adiposo adjacente à mama excisada. Os fragmentos obtidos foram mantidos sob refrigeração à temperatura de -4 °C até a análise toxicológica realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*- HPLC), segundo o método descrito por BISSACOT e VASSILIEFF (1997), adaptado para a determinação quantitativa

das concentrações de resíduos de piretróides nas amostras de tecido adiposo e mamário.

Ambos os tecidos das 50 cadelas selecionadas foram processados para extração dos princípios ativos aletrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina de acordo com os critérios utilizados no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu/SP.

4.9 Ensaio Cometa

Para o Ensaio Cometa foram colhidas células das neoplasias mamárias e das mamas inguinais das cadelas sem tumor de mama durante o procedimento cirúrgico de mastectomia e ovariossalpingohisterectomia eletiva, respectivamente. As amostras foram obtidas por citopunção com aspiração utilizando-se agulha descartável 26G 1/2 acoplada a uma seringa de 10 ml.

O Teste foi conduzido no Laboratório de Toxicogenômica e Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina, do Departamento de Patologia da UNESP/Botucatu/SP de acordo com as metodologias descritas por SINGH et al. (1988) com modificações e todas as etapas foram realizadas sob luz indireta.

Como no referido teste analisa-se cada célula individualmente e as células colhidas, principalmente das mamas não neoplásicas permaneciam agregadas, estas precisaram passar por um processo de separação enzimática. Para tanto, as amostras obtidas foram mergulhadas em solução de tripsina pronta para uso (LGC biotecnologia), incubadas a 37°C durante 30 minutos e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de células foi ressuspenso com 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS) livre de cálcio e magnésio e novamente centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos.

Uma alíquota de 30 µl da suspensão das células tumorais ou das células da mama normal foi misturada a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %) e colocada sobre uma lâmina previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal. Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula e deixada a 4°C por 5 minutos para solidificar a agarose.

Após esse período, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para uma solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM, lauril sarcosinato de sódio 1 %, pH 10; Triton X-100 1% e DMSO 10%) por 24 horas. As lâminas foram então lavadas em PBS e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese preenchida com tampão alcalino (EDTA 1mM e NaOH 300 mM, pH 13), durante 20 minutos. Na sequência, foi conduzida a eletroforese a 25 V e 300 mA por outros 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos, desidratadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas para posterior coloração e análise do DNA dessas células.

As amostras das 50 cadelas selecionadas foram analisadas quanto a extensão do dano do DNA no Laboratório de Imunoistoquímica e Eletroforese do Departamento de Morfologia/Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu/SP. Para cada amostra foram feitas lâminas em duplicata e foram analisados 100 nucleóides por amostra, sendo 50 nucleóides em cada lâmina. Para a análise, os nucleóides foram corados com *Syber Green* (Sigma, St Louis, MO, EUA) e avaliados em microscópio de fluorescência acoplado ao sistema de análise de imagem Comet Assay II - Perspective Instruments (Haverhill, Inglaterra). O parâmetro utilizado para mensurar os danos no DNA foi o *tail intensity* que representa a intensidade do DNA e sua porcentagem contida na cauda do cometa.

4.10 Análise estatística

Tanto a avaliação da associação entre a presença de piretróides na mama e tecido adiposo em cadelas com carcinoma de mama quanto a frequência dos resíduos foi feita pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), sendo para isto, os dados organizados em tabela de contingência, adotando-se o nível de significância $p \leq 0,05$ (SNEDECOR e COCHRAN, 1994).

Para a análise de intensidade de dano no DNA em células de mama, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco grupos e 10 repetições. As médias dos grupos foram comparadas através do teste de Tukey. A comparação da intensidade de dano no DNA nas células de

carcinoma de mama das cadelas expostas e não expostas aos resíduos piretróide foi feita usando-se o teste t de Student. Foi adotado o nível de significância $p \leq 0,05$ (SNEDECOR e COCHRAN, 1994).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Associação entre resíduos de piretróides em mama e no tecido adiposo e a agressividade dos carcinomas mamários de cadelas

A marcação das células de carcinoma de mama das cadelas deste estudo pelo RE α (Figura 1) e p63 (Figura 2) revelou o padrão habitual de coloração nuclear, enquanto que a marcação pelo anticorpo HER-2 foi citoplasmática (Figura 3).

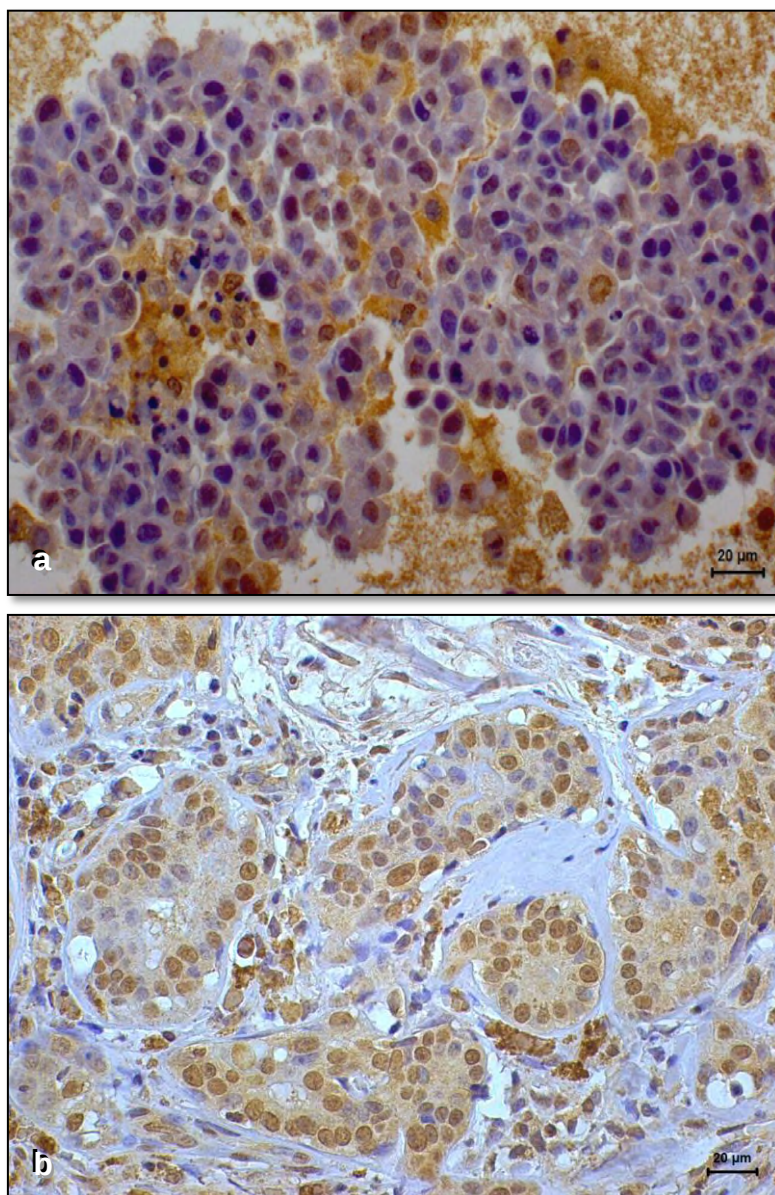


Figura 1. Imunoexpressão de receptor de estrógeno- α em carcinoma de mama de cadela. **a)** Ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); **b)** Marcação nuclear nas células neoplásicas (imunorreatividade em mais de 10% das células neoplásicas; reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).

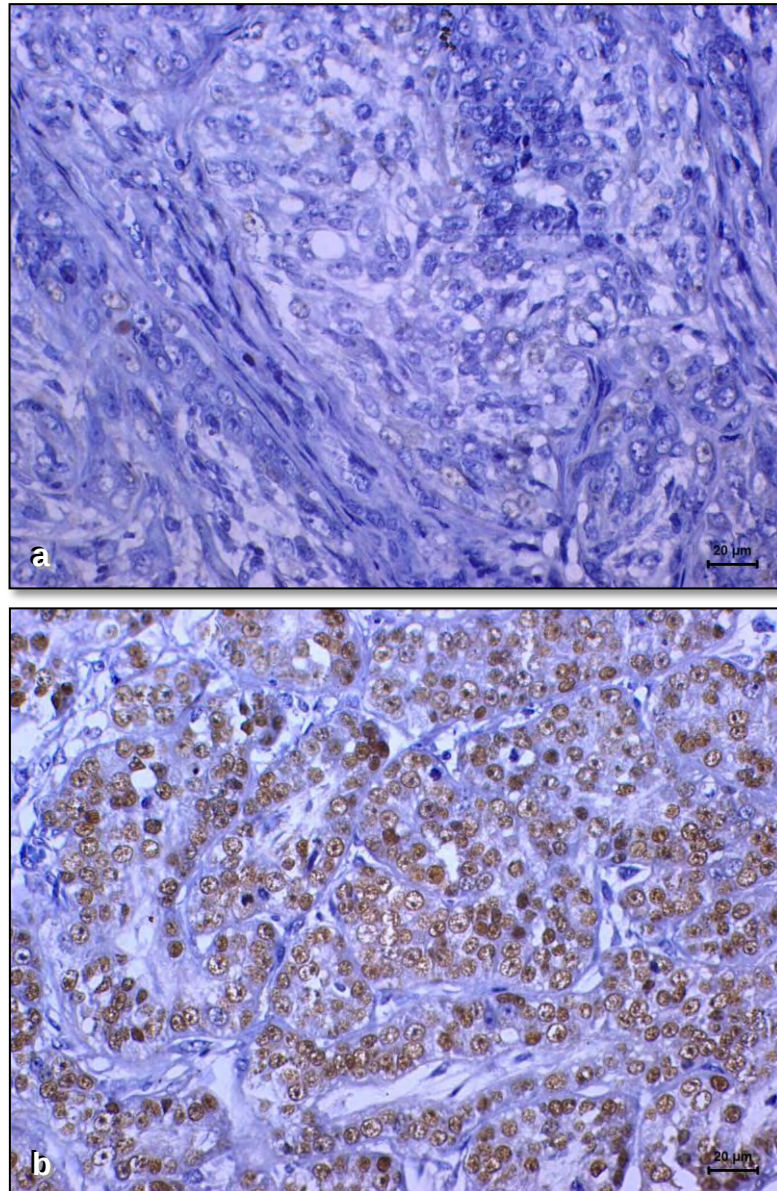


Figura 2. Imunoexpressão de p63 em carcinomas de mama de cadelas. **a)** Ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); **b)** Marcação nuclear positiva em mais de 50% das células neoplásicas (reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).

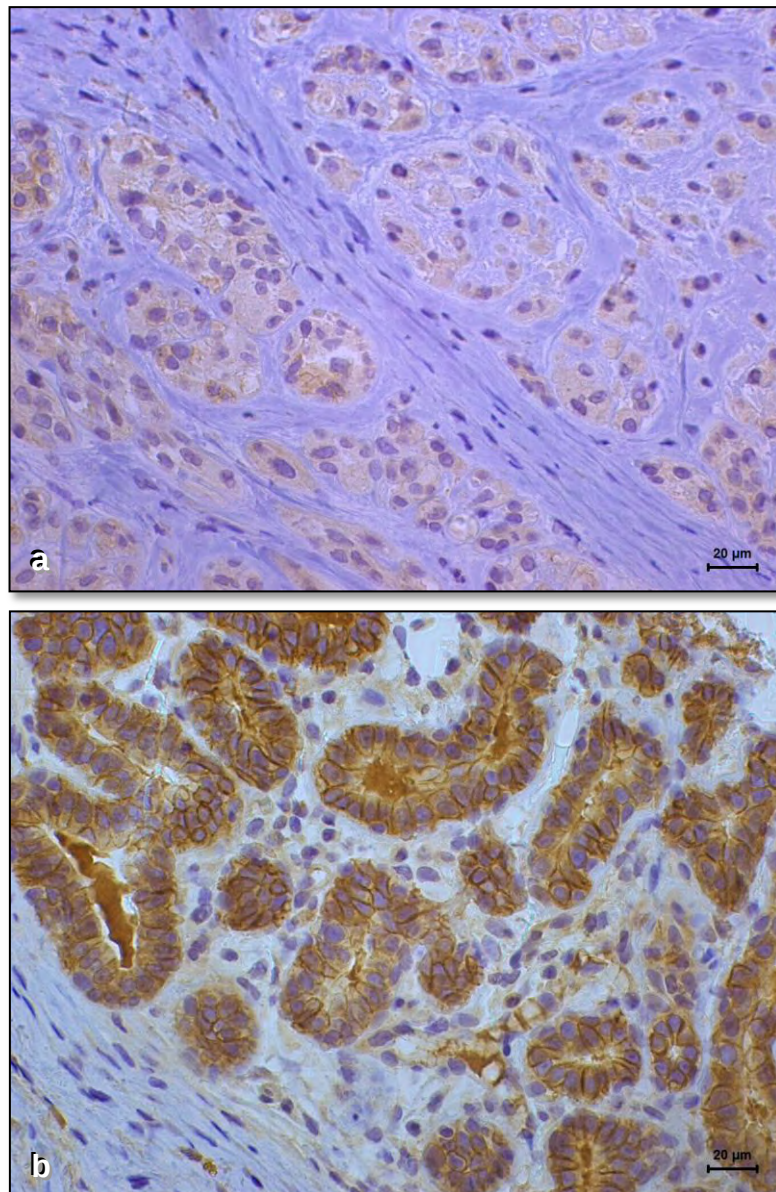


Figura 3. Imunoexpressão de HER-2 em carcinomas mamários de cadelas. **a)** ausência de marcação nas células neoplásicas (resultado negativo); **b)** marcação positiva 3+ (acentuadamente positiva; marcação completa de membrana; reação positiva). (DAB, NovoLink, contracoloração com hematoxilina de Harris).

Entre as amostras de mama das 50 cadelas avaliadas neste experimento, 44 não apresentaram resíduos de piretróides e seis (12%) apresentaram-se com resíduos de um ou mais piretróides (Tabela 3). Pelo teste de χ^2 não houve associação entre a presença de piretróide em mama com a ocorrência de carcinoma nos diferentes graus imunoistoquímicos de malignidade ($p>0,05$).

Tabela 3. Frequências de resíduos de piretróides na mama normal (Grupo Controle) e nos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.

Grupos	Resíduos de piretróides		n
	Ausência	Presença	
Controle	9	1	10
Luminal A	8	2	10
Luminal B	8	2	10
Superexpressão de HER-2	9	1	10
Basal	10	0	10
Total	44	6	50

p=0,6177

χ^2 calculado = 2,652

Em relação à presença de piretróides no tecido adiposo das 50 cadelas deste estudo, 40 não apresentaram resíduos de piretróides neste tecido e 10 (20%) apresentaram (Tabela 4). Pelo teste de χ^2 , não houve associação entre a presença de piretróide no tecido adiposo com a ocorrência de carcinoma nos diferentes graus imunoistoquímicos de malignidade ($p>0,05$).

Tabela 4. Frequências de resíduos de piretróides no tecido adiposo adjacente a mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.

Grupos	Resíduos de piretróides		n
	Ausência	Presença	
Controle	7	3	10
Luminal A	10	0	10
Luminal B	9	1	10
Superexpressão de HER-2	6	4	10
Basal	8	2	10
Total	40	10	50

p=0,1812

χ^2 calculado = 6,25

Ao associar as 100 amostras analisadas (50 de mama e 50 de tecido adiposo), embora a relação entre os níveis de cada um dos resíduos de piretróides investigados e o fenótipo imunoistoquímico dos carcinomas não tenha sido significativa ($p=0,3365$), pelo teste de χ^2 (χ^2 calculado = 13,46), observou-se que o resíduo mais frequente foi a deltametrina, a qual foi detectada em sete cadelas (uma do Grupo Controle e duas em cada um dos

grupos: Luminal A, Luminal B e Superexpressão de HER-2). O segundo piretróide mais encontrado foi a cipermetrina seguido da aletrina (Figura 4).

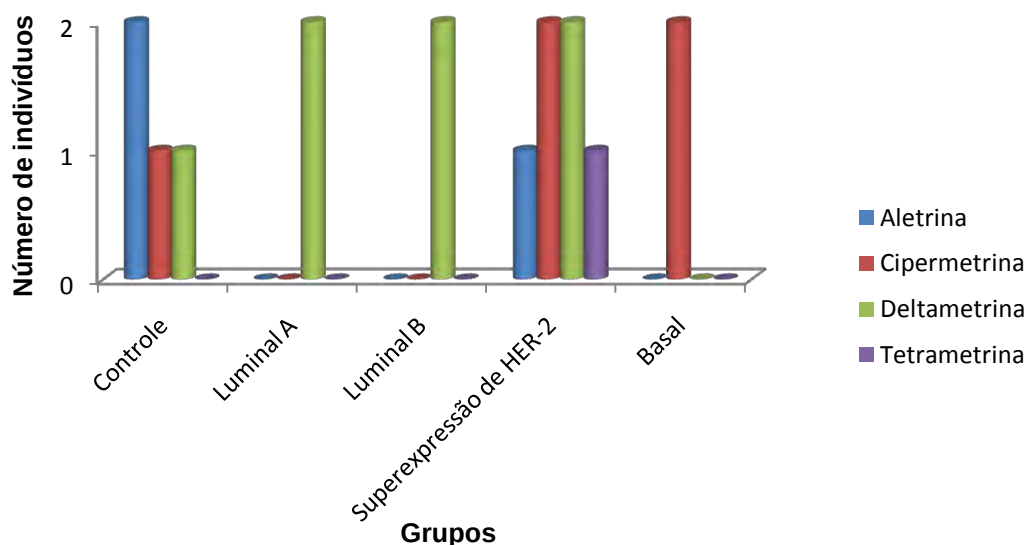


Figura 4. Identificação de cada piretróide investigado na mama e no tecido adiposo adjacente à mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.

Quanto à quantificação dos piretróides, observou-se distribuição heterogênea na quantidade (em $\mu\text{g/g}$) de cada resíduo investigado entre os grupos avaliados e entre as amostras de mama e de tecido adiposo em um mesmo animal (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação (em $\mu\text{g/g}$) de cada piretróide investigado na mama e no tecido adiposo adjacente à mama normal (Grupo Controle) e aos carcinomas mamários (grupos Luminal A, Luminal B, Super expressão de HER-2 e Basal) de 50 cadelas.

Controle		Luminal A		Luminal B		Superexpressão de HER-2		Basal	
Mama	Tecido Adiposo	Mama	Tecido Adiposo	Mama	Tecido Adiposo	Mama	Tecido Adiposo	Mama	Tecido Adiposo
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	0,02 ^D	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,99 ^C
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,68 ^C
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,20 ^A	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1,23 ^A	0,47 ^A	nd	nd	0,17 ^D	0,02 ^D	nd	nd	nd	nd
0,12 ^D	nd	0,09 ^D	nd	nd	nd	nd	0,30 ^C	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,18 ^D	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,25 ^C	nd	nd
nd	0,93 ^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	0,15 ^C	nd	nd	0,97 ^D	nd	0,30 ^D	0,93 ^T	nd	nd

Limite de detecção = 0,001 $\mu\text{g/g}$

nd = não detectado

A = Aletrina; C = Cipermetrina; D = Deltametrina; T = Tetrametrina

5.2 Associação entre a intensidade de dano no DNA, resíduos de piretróides e agressividade dos carcinomas mamários de cadelas

Ao Ensaio Cometa, as células de mama neoplásicas e não neoplásicas citoaspiradas e tratadas com tripsina adquiriram o aspecto esperado de um cometa, com cabeça e cauda, cuja extensão variou com a intensidade de dano no DNA (Figura 5).

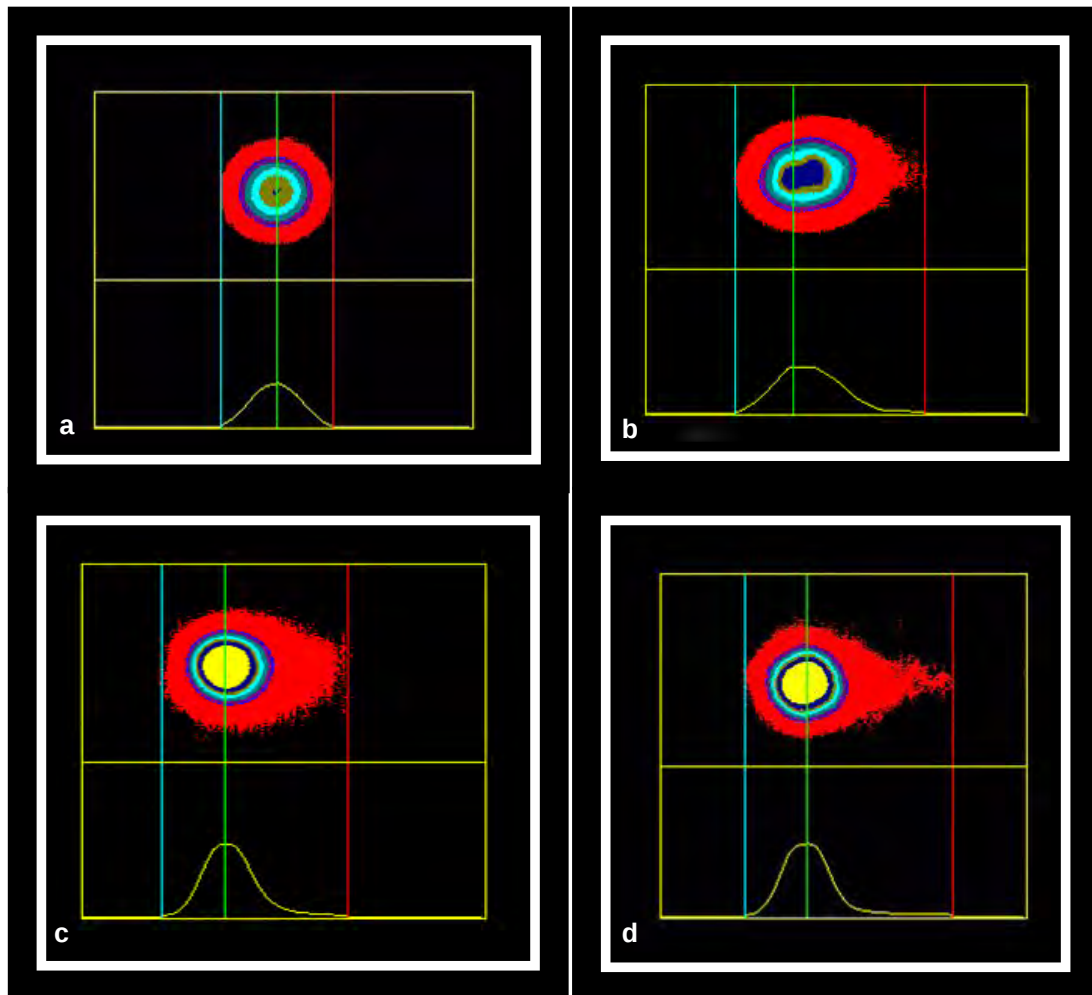


Figura 5. Fotomicrografias de células neoplásicas de mama de cadelas submetidas ao Ensaio Cometa. Extensão da migração do DNA (cauda). **a)** Sem cauda, e com tamanhos diferentes de cauda (**b, c, d**). *Syber Green*, microscopia de fluorescência, 40x.

Não houve diferença estatística entre a intensidade de dano no DNA das células das mamas não neoplásicas e das células das mamas que apresentavam carcinoma ($p > 0,05$) (Tabela 6). Ao comparar as diferenças na intensidade de dano entre os tipos imunoistoquímicos dos carcinomas avaliados, observou-se que a intensidade de dano no DNA foi discretamente

maior nas células de carcinoma do tipo Luminal A em relação às células de carcinoma do tipo Luminal B e o dano nesta foi maior em relação as células do tipo Superexpressão de HER-2, as quais também apresentaram maior dano em relação ao tipo Basal, no entanto, as diferenças não foram significativas ($p>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Médias e respectivos desvios padrões (s) da intensidade de dano no DNA em células de mama não neoplásicas (Grupo Controle) e células de mama que apresentavam carcinoma (grupos Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal) de cadelas.

Grupos	Intensidade de dano no DNA	n
	Média $\pm$ s	
Controle	5,95 $\pm$ 1,73 a	10
Luminal A	11,40 $\pm$ 7,55 a	10
Luminal B	10,70 $\pm$ 3,16 a	10
Superexpressão de HER-2	10,47 $\pm$ 4,81 a	10
Basal	10,13 $\pm$ 4,34 a	10
p=0,098		

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Ao comparar à intensidade de dano no DNA das células de carcinoma de mama expostas e não expostas aos piretróides, a diferença não foi significativa ($p>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Médias e seus respectivos desvios padrões (s) da intensidade de dano no DNA em células de carcinoma de mama de cadelas expostas e não expostas aos piretróides.

Piretróide	Intensidade de dano no DNA	n
Células não expostas	10,83 $\pm$ 5,17 a	30
Células expostas	10,21 $\pm$ 4,83 a	10

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste t de Student ($p>0,05$).

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Associação entre resíduos de piretróides em mama e no tecido adiposo e agressividade dos carcinomas mamários de cadelas

A avaliação da expressão gênica das neoplasias de mama da mulher, geralmente utilizando técnica como o TMA, permite a identificação taxonômica de subtipos distintos de carcinomas como: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal (PEROU et al., 2000). Estes subtipos moleculares não apenas refletem a heterogeneidade dos carcinomas de mama, mas também auxiliam no prognóstico dessas neoplasias, por exemplo, o subtipo Luminal A está associado a uma melhor resposta terapêutica, ao contrário, o subtipo Basal está associado ao comportamento mais agressivo e a pior resposta ao tratamento (SORLIE et al., 2001; SORLIE, 2004; SORLIE et al., 2006). Nas neoplasias de mama dos caninos, a perda de receptores hormonais na progressão tumoral, bem como a superexpressão de HER-2 em malignidades, também tem permitido a classificação molecular dos carcinomas em subgrupos e a correlação com o prognóstico, similar ao câncer de mama do homem (GAMA et al., 2008; SASSI et al., 2010).

Foi nesse cenário, em que grupos genéticos distintos se traduzem por fenótipos imunoistoquímicos próprios, que este estudo se propôs a identificar e quantificar resíduos de piretróides em carcinoma de mama espontâneo de cadelas correlacionando-os com o perfil imunoistoquímico de agressividade dessas neoplasias. A presença de resíduos de piretróide já havia sido detectada na gordura adjacente a mama neoplásica de cadelas (ANDRADE et al., 2010; BARIANI e ROCHA, 2010), no entanto, não foram encontrados, até onde pudemos pesquisar, ensaios que buscassem evidenciar resíduos de piretróides no próprio tecido tumoral, assim como não foi encontrado qualquer estudo procurando relacionar estes inseticidas aos imunofenótipos de agressividade da neoplasia.

No presente experimento, os resíduos dos piretróides aletrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina foram detectados em algumas amostras de tecido adiposo adjacente à mama não neoplásica e neoplásica e na própria mama não neoplásica e neoplásica, mas a presença, o tipo e a

quantidade dos piretróides pesquisados não estavam associados ao perfil imunoistoquímico de agressividade dos carcinomas.

Porém, se for considerado que o maior uso de praguicidas é no meio rural (RITTER, 1997; BARLOW et al., 2001), que nos cães a pele é uma importante via de contato com os piretróides (ANADÓN et al., 2009) e que os resíduos deste inseticida são eliminados da gordura no período médio de um mês após a exposição (CRAWFORD et al., 1981; APPEL e GERICKE, 1993), a falta de associação estatística observada neste estudo pode ter ocorrido porque todas as cadelas utilizadas habitavam na zona urbana e não haviam recebido piretróide via cutânea por no mínimo 60 dias. Portanto, os resultados podem ter sido subestimados já que neste tempo provavelmente a maioria reduziu o grau de exposição aos resíduos investigados.

Por outro lado, ao considerar que todos os animais desta pesquisa tinham acesso ao interior das residências dos proprietários e recebiam dieta mista (ração comercial e alimentos caseiros), a presença de resíduos de piretróides no tecido adiposo e/ou na mama demonstra a influência do meio na contaminação desses animais já que atualmente, os praguicidas também são amplamente utilizados no ambiente domiciliar e peridomiciliar humano para controle de insetos (RITTER, 1997), como a deltametrina e cipermetrina, inseticidas mais detectados nas cadelas deste experimento. Adicionalmente, a dieta pode estar envolvida neste contexto, uma vez que nestes animais, a via oral também é uma importante rota de exposição aos piretróides (ANADÓN et al., 2009).

Na maioria das pesquisas publicadas a quantificação dos praguicidas é realizada somente em um componente, sangue/soro ou tecido. Neste estudo, optou-se por analisar a exposição mediante a quantificação de resíduos de piretróides na mama e no tecido adiposo adjacente à mama normal ou neoplásica baseando-se na premissa conceitual de que a mama, neste caso, poderia ser o foco de atuação do inseticida e o tecido adiposo seria o reservatório do composto lipossolúvel e, portanto, poderia proporcionar informações sobre a história expositiva dos animais submetidos ao ensaio. Além disso, dispor, da avaliação dos índices de piretróides no tecido adiposo mamário e na própria mama de uma mesma cadela seria uma situação não

habitual e que poderia proporcionar dados para comparação da distribuição tecidual deste inseticida.

De fato, foi observado que apenas quatorze cadelas deste experimento apresentaram resíduos de piretróides na mama e/ou tecido adiposo, sendo que duas destas apresentaram resíduos de mais de um dos piretróides investigados, entretanto, nas cadelas que apresentaram resíduos, observou-se heterogeneidade na distribuição e provavelmente na velocidade de eliminação desses inseticidas entre as amostras de mama e de tecido adiposo em um mesmo animal. Esse dado reforça a hipótese comprovada por CRAWFORD et al. (1981) de que há variação tecidual no metabolismo desse inseticida. No entanto, as diferenças metabólicas dos piretróides entre a mama e o tecido adiposo observadas, e seu significado clínico, precisam ser melhor investigadas, já que a detecção de resíduos de piretróides no tecido neoplásico é, provavelmente, um dado inédito e desconhece-se a cinética deste inseticida neste tecido.

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) inclui os piretróides, especialmente a deltametrina e cipermetrina, no Grupo 3 do nível de risco (IARC, 2005), ou seja, não classificada para a carcinogênese em humanos, enquanto que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - U.S. EPA) classifica a permetrina e a resmetrina como provável cancerígeno para humanos (Grupo 2) (U. S. EPA, 2007). Apesar dos piretróides serem classificados, em algumas situações, como não cancerígenos, existem evidências da atividade carcinogênica desses compostos, tanto no homem (BROWN et al., 1990; ALAVANJA et al., 2003; RUSIECKI et al., 2009) quanto em outros animais (CABRAL e GALENDO, 1990; CABRAL et al., 1990; DEGUCHI et al., 2009).

Dessa forma, é importante ressaltar que os mesmos cuidados indicados para o uso de substâncias já consagradas como cancerígenas, devem ser adotados para a utilização dos piretróides. Ainda, ao se pensar que o câncer pode ter um período longo de latência e que relacioná-lo com a exposição a um praguicida específico é difícil, mesmo que nesse estudo não tenha sido observada essa relação, novas pesquisas devem ser estimuladas,

principalmente sobre o câncer de mama, cujas publicações buscando uma ligação entre este tipo particular de câncer e os piretróides (PARKER et al., 1984a; ENGEL et al., 2005) são escassas e contraditórias.

6.2 Associação entre a intensidade de dano no DNA, resíduos de piretróides e agressividade dos carcinomas mamários de cadelas

O Ensaio Cometa é um método de estudo genotóxicológico preciso, de fácil reprodutibilidade e, acima de tudo, sensível para avaliar, em células individuais, quebras de fitas simples e duplas e sítios álcali-lábeis no DNA. Pequena quantidade de qualquer tipo celular pode ser avaliada, bastando que as células sejam nucleadas (SINGH et al., 1988; WOZNIAK et al., 2007; NOSSONI, 2008). A análise dos cometas baseia-se no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela eletroforese. Medidas como o comprimento total da cauda e a densidade de DNA fornecem dados indiretos do estado do DNA da amostra (NOSSONI, 2008; COLLINS et al., 2008). Não foram encontradas, até então, publicações de experimentos utilizando esta técnica nas células de mama dos caninos, levando a supor a sua inexistência. Com o Ensaio Cometa aplicado às células das mamas neoplásicas e não neoplásicas das cadelas desse estudo, foi possível observar a intensidade de dano no DNA dessas células.

Apesar de não ser observada diferença estatística ao comparar a intensidade de dano no DNA das células neoplásicas com o perfil imunoistoquímico de agressividade dos carcinomas de mama das cadelas deste experimento, os valores de *tail intensity* encontrados nos carcinomas menos agressivos (Luminal A e B), de agressividade intermediária (Superexpressão de HER-2) e altamente agressivos (Basal) apresentaram certa lógica. Baseando-se nas diferenças, mesmo que sutis, poderia se dizer que a intensidade de migração no DNA das células de mama apresentou um comportamento decrescente do carcinoma menos agressivo para o mais agressivo.

Uma possível explicação para essa leve diferença pode estar no fenômeno da apoptose. Considerando que a apoptose tem um papel oposto ao

da mitose no controle da proliferação celular, permitindo a remoção de excesso de células normais ou danificadas de um tecido (ECKLE et al., 2004), o maior dano detectado no DNA pode ter relação com o processo de apoptose a qual nos carcinomas mamários menos agressivos seria mais intensa que nos mais agressivos. No entanto, a associação do índice de apoptose e atividade proliferativa nos imunofenótipos do carcinoma de mama das cadelas ainda precisa ser investigada.

Porém, é importante ressaltar que as diferenças na intensidade de dano do DNA dos carcinomas das cadelas dos diferentes grupos não foram significativas. A partir desse fato, desconsiderou-se a divisão dos grupos de acordo com o grau de agressividade das neoplasias mamárias e foi avaliado se a intensidade do dano dessas células poderia ter sido influenciada pela exposição aos inseticidas piretróides. Observou-se que o dano no DNA não teve relação com os piretróides, haja vista que a intensidade de dano entre as células neoplásicas e não neoplásicas expostas aos piretróides foi similar.

É difícil estabelecer uma associação causa e efeito para o câncer, particularmente para o câncer de mama. A instabilidade do genoma é provavelmente um dos mais importantes aspectos das neoplasias malignas (COLLEU-DUREL et al., 2004). Muitos estudos moleculares têm sido realizados para elucidar a relação entre a ocorrência de lesões no DNA e o risco de câncer. Portanto, identificar compostos capazes de alterar a informação genética, compreender os mecanismos pelos quais essa informação é alterada e como a lesão do DNA pode ser corrigida, são fundamentais para a prevenção do câncer (LUCK, 2005). Como neste experimento, através do Ensaio Cometa, observou-se que a intensidade de dano no DNA nas células do carcinoma de mama não tem relação com a exposição dessas células aos resíduos de piretróides poderia se pensar que se os piretróides participam da carcinogênese não é por mecanismos genotóxicos como investigado por TISCH et al. (2002), GABBIANELLI et al. (2004) e GABBIANELLI et al. (2009) mas, provavelmente, por mecanismos não genotóxicos como sugerido por EL-TOUKHY et al. (1989), TATENO et al. (1993), GO et al. (1999) e DEGUCHI et al. (2009).

No entanto, os resultados obtidos no presente estudo referem-se a poucas amostras celulares. Obviamente, futuras investigações, envolvendo amostras maiores e diferentes metodologias, devem ser sustentadas a fim de esclarecer se a intensidade da lesão genômica pode influenciar no comportamento biológico e consequentemente o prognóstico dos carcinomas de mama das cadelas e se de fato os piretróides não são genotóxicos.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Sob as condições experimentais propostas e na amostra selecionada para o presente estudo foi possível concluir que:

Não há evidência estatística de que os piretróides aletrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina estejam envolvidos na agressividade dos carcinomas de mama das cadelas.

A intensidade de dano no DNA das células de mama das cadelas com carcinoma menos agressivo é semelhante à intensidade de dano no DNA das células com carcinoma com agressividade intermediária e com carcinoma altamente agressivo e os danos não estão relacionados à exposição das células desses carcinomas aos resíduos de aletrina, cipermetrina, deltametrina e tetrametrina.

Perspectivas futuras

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, ficou evidente a necessidade de:

Estudar a cinética dos piretróides na mama normal e neoplásica e comparar com a cinética de outros tecidos, principalmente do tecido adiposo, para avaliar se as variações teciduais podem representar algum risco para a carcinogênese mamária;

Investigar, a partir de protocolos pré-estabelecidos, se as concentrações dos piretróides diferem nos diferentes graus imunoistoquímicos de agressividade dos carcinomas de mama das cadelas;

Aumentar o número de casos e aplicar outras metodologias para averiguar possíveis danos genotóxicos e mutagênicos nas células epiteliais mamárias de animais que apresentem diferentes concentrações teciduais de resíduos de piretróides;

Investigar a expressão dos genes metabolizadores de xenobióticos, do gene pS2 (responsivo ao estrógeno), de enzimas metabolizadoras do triptofano, e das junções comunicantes intercelulares do tipo GAP, nas células dos carcinomas de mama de cadelas expostas aos piretróides para elucidar se essa classe de inseticida atua na promoção e progressão da carcinogênese mamária.

Referências

9. REFERENCIAS*

- ALAVANJA, M.C.R.; DOSEMECI, M.; SAMANIC, C.; LUBIN, J.; LYNCH, C.F.; KNOTT, C.; KNOTT, C.; BARKER, J.; HOPPIN, J.A.; SANDLER, D.P.; COBLE, J.; THOMAS, K.; BLAIR, A. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. **American Journal of Epidemiology**, v.160, n.9, p.876-885, 2004.
- ALAVANJA, M.C.R.; SAMANIC, C.; DOSEMECI, M.; LUBIN, J.; TARONE, R.; LYNCH, C. F.; KNOTT, C.; THOMAS, K.; HOPPINS, J. A.; BARKER, J.; COBLE, J.; SANDLER, D.P.; BLAIR, A. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. **American Journal of Epidemiology**, v.157, n.9, p.800-814, 2003.
- ALLEN, S.W.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.23, n.6, p.649-655, 1986.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.182, n.1, p.7-20, 2009.
- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRANGA, M.R.; DIAZ, M.J.; BRINGAS, P. Toxicokinetics of permethrin in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.110, n.1, p.1-8, 1991.
- ANDRADE, F.H.E.; FIQUEIROA, F.C.; BERSANO, P.R.O.; BISSACOT, D.Z.; ROCHA, N.S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v.5, n.1, p.45, 2010.
- ANDREOTTI, G.; FREEMAN, L.E.; HOU, L.; COBLE, J.; RUSIECKI, J.; HOPPIN, J.A.; SILVERMAN, D.T.; ALAVANJA, M.C. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. **International Journal of Cancer**, v.124, n.10, p.2495-2500, 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monografias/index.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2011.
- APPEL, K.E.; GERICKE, S. Zur Neurotoxizität und toxikokinetik von pyrethroiden. **Bundesgesundheitsblatt**, v.6, p.219-228, 1993.
- ARAUJO, R.W.; PAIVA, V.; GARTNER, F.; AMENDOEIRA, I.; OLIVEIRA, J.M.; SCHMITT, F.C. Fine needle aspiration as a tool to establish primary human breast cancer cultures in vitro. **Acta Cytologica**, v.43, p.985-990, 1999.
- AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE & AUSTRALASIAN ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES 2010. **Cancer in Australia 2010: an overview**. Cancer series nº 60. Cat. nº CAN 56. Canberra: AIHW.
- BHARGAVA, R.; ESPOSITO, N.N.; DABBS, D.J. Immunohistology of the breast. In: DABBS, D.J. Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic applications. Philadelphia: Saunders. 2010, p.763-819.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS - ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BARIANI, M.H.; ROCHA, N.S. residues of pyrethroids in the adipose tissue adjacent to spontaneous mammary carcinoma in female dogs. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, a.VIII, n.15, 2010.
- BARLOW, S.M.; SULLIVAN, F.M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. **Food & Chemical Toxicology**, v.39, n.5, p.407-422, 2001.
- BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast carcinoma: principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.5, n.10, p.772-786, 2006.
- BISSACOT, D.Z.; VASSILIEFF, I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in milk and blood of lactating dairy cows. **Journal of Analytical Toxicology**, v.21, p.397-402, 1997.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2. 2009.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>> Acesso em: 08 abr 2011.
- BROWN, L.M.; BLAIR, A.; GIBSON, R.; EVERETT, G.D.; CANTOR, D.P.; SCHUMAN, L.M.; BURMEISTER, L.F.; VAN LIER, S.F.; DICK, F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. **Cancer Research**, v.50, n.20, p.6585-6591, 1990.
- BRUZZONE, R.; WHITE, T.W.; PAUL, D.L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signalling. **European Journal Biochemistry**, v.238, n.1, p.1-27, 1996.
- BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes/OXFAM/FASE, 236p. 1986.
- BULLIVANT, M.J.; PATTENDEN, G. Photodecomposition of natural pyrethrins and related compounds. **Pesticide Science**, v.7, n.3, p.231-235, 1976.
- CABRAL, J.R.P.; GALENDO, D. Carcinogenicity study of the pesticide fenvalerate in mice. **Cancer Letters**, v.49, n.1, p.13-18, 1990.
- CABRAL, J.R.P.; GALENDO, D.; LAVAL, M.; LYANDRAT, N. Carcinogenicity studies with deltamethrin in mice and rats. **Cancer Letters**, v.49, n.2, p.147-152, 1990.
- CAMERON, H.L.; FOSTER, W.G. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. **Phos one**, v.4, n.4303, p.1-8, 2009.
- CANADIAN CANCER SOCIETY, STATISTICS CANADA, PROVINCIAL/TERRITORIAL CANCER REGISTRIES, PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Canadian cancer statistics 2009**. Disponível em: <<http://www.cancer.ca/canada-wide/about%20cancer/cancer%20statistics>> Acesso em: 16 mar 2011.
- CASIDA, J.E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v.34, p.189-202, 1980.

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

CHEN, S.Y.; ZHANG, Z.W.; HE, F.S.; YAO, P.P.; WU, Y.Q.; SUN, J.X.; LIU, L.H.; LI, Q.G. An epidemiological study on occupational acute pyrethroid poisoning in cotton farmers. **British Journal of Industrial Medicine**, v.48, n.2, p.77-81, 1991.

COLLEU-DUREL, S.; GUITTON, N.; NOURGALIEVA, K.; LEGUE, F.; LEVEQUE, J.; DANIC, B.; CHENAL, C. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. **European Journal of Cancer**, v.40, p.445-451, 2004.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, p.143-151, 2008.

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

DAGLI, M.L.Z. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. **Veterinary Journal**, v.177, n.1, p.3-5, 2008.

DEGUCHI, Y.; YAMADA, T.; HIROSE, Y.; NAGAHORI, H.; KUSHIDA, M.; SUMIDA, K. SUKATA, T.; TOMIGAHARA, Y.; NISHIOKA, K.; UWAGAWA, S.; KAWAMURA, S.; OKUNO, Y. Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. **Toxicological Science**, v.108, n.1, p.69-80, 2009.

DENNIS, L.K.; LYNCH, C.F.; SANDLER, D.P.; ALAVANJA, M.C.R. Pesticide Use and Cutaneous Melanoma in Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **Environmental Health Perspective**, v.118, p.812-817, 2010.

DIGIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacology & Therapeutic**, v.54, n.1, p.63-128, 1992.

ECKLE, V.S.; BUCHMANN, A.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R.; SCHWARZ, M. Immunohistochemical detection of activated caspases in apoptotic hepatocytes in rat liver. **Toxicologic Pathology**, v.32, p.9-15, 2004.

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

ELLIOTT, M.; FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; SODERLUND, D.M. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-phenoxybenzyl esters. **Pesticide Science**, v.9, n.2, p.112-116, 1978.

EL-TOUKHY, M.A.; EBIED, S.A.; HASSAN, A.A.; EL-SEWEDY, S.M. In vivo studies on the effect of some insecticides on the hepatic activities of L-tryptophan 2,3-dioxygenase and pyridoxal phosphokinase of male mice. **Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.24, n.3, p.265-276, 1989.

ENGEL, L.S.; HILL, D.A.; HOPPIN, J.A.; LUBIN, J.H.; LYNCH, C.F.; PIERCE, J.; SAMANIC, C.; SANDLER, D.P.; BLAIR, A.; ALAVANJA, M.C.R. Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. **American Journal of Epidemiology**, v.161, n.2, p.121-35, 2005.

FANTON, J.W.; WITHROW, S.J. Canine mammary neoplasia: an overview. **California Veterinarian**, v.7, p.12-16, 1981.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B.A. Genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, n.5, p.759-767, 1990.

FERRARI, A. **Agrotóxicos: a praga da dominação, o custo ambiental e social de uma agricultura dependente**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1985. 87p. (série depoimentos, 13).

GABBIANELLI, R.; FALCIONI, M.L.; CANTALAMESSA, F.; NASUTI, C. Permethrin induces lymphocyte DNA lesions at both Endo III and Fpg sites and changes in monocyte respiratory burst in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v.29, n.4, p.317-322, 2009.

GABBIANELLI, R.; NASUTI, C.; FALCIONI, G.; CANTALAMESSA, F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with vitamins E and C. **Toxicology**, v.203, n.1-3, p.17-26, 2004.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v.453, p.123-132, 2008.

GAP. 2010. GAP Report™. **Measuring Global Agricultural Productivity**. The Global Harvest Initiative, global harvest initiative, 9p., 2010. Disponível em: <<http://www.globalharvestinitiative.org/documents/GAP%20Report.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

GEHLEN, I. Políticas públicas e desenvolvimento social rural. **São Paulo em Perspectiva**, v.18, n.2, p.95-103, 2004.

GLICKMAN, A.H.; CASIDA, J.E. Species and structural variations affecting pyrethroid neurotoxicity. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v.4, p.793-799, 1982.

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

GOLDBERG, A.A.; HEAD, S.E.; JOHNSTON, P. Action of heat on pyrethrum extract: The isomerisation of pyrethrins to isopyrethrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.16, n.1, p.43- 51, 1965.

GRANDI, F.; COLODEL, M.M.; MONTEIRO, L.N.; LEÃO, J.R.V.P.; ROCHA, N.S. Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. **BMC Veterinary Research**, v.6, p.45, 2010.

GUYTON, K.Z.; KENSLER, T.W. Oxidative mechanism in carcinogenesis. **British Medical Bulletin**, v.49, p.523-544, 1993.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HE, F.; WANG, S.; LIU, L.; CHEN, S.; ZANG, Z.; SUN, J. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. **Archives of Toxicology**, v.63, n.1, p.54-58, 1989.

HIDALGO, A.; PIÑA, P.; GUERRERO, G.; LAZOS, M.; SALCEDO, M. A simple method for the construction of small format tissue arrays. **Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.2, p.144-146, 2003.

HIROSE, Y.; NAGAHORI, H.; YAMADA, T.; DEGUCHI, Y.; TOMIGAHARA, Y.; NISHIOKA, K.; UWAGAWA, S.; KAWAMURA, S.; ISOBE, N.; LAKE, B.G.; OKUNO, Y. Comparison of the effects of the synthetic pyrethroid Metofluthrin and phenobarbital on CYP2B form induction and replicative DNA synthesis in cultured rat and human hepatocyte. **Toxicology**, v.258, p.64-69, 2009.

IARC, 2005. International Agency For Research Cancer. **Overall evaluations of carcinogenicity to humans**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-10.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

ISHMAEL, J.; LITCHFIELD, M. H. Chronic toxicity and carcinogenic evaluation of permethrin in rats and mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.11, n.2, p.308-322, 1988.

JOHNSTONE, E.C.; LIND, M.J.; GRIFFIN, M.J.; BODDY, A.V. Ifosfamide metabolism and DNA damage in tumour and peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.46, p.433-441, 2000.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v.105, n.3, p.197-205, 1999.

KANEKO, H.; OHAKAWA, H.; MIYAMOTO, J. Absorption and metabolism of dermally applied phenothrin in rats. **Journal of Pesticide Science**, v.6, p.169-182, 1981.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A.D. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v.10, p.618, 2010.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHOST, J.; MIHATSCH, M.J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. **Nature Medicine**, v.4, n.7, p.844-847, 1998.

KÜHN, K.H.; WIESELER, B.; LENG, G.; IDEL, H. Toxicokinetics of pyrethroids in humans: consequences for biological monitoring. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.62, n.2, p.101-108, 1999.

LAUTRAITE, S.; SARGENT, D. Pyrethroids toxicology – A review of attributes and current issues. **Bayer CropScience Journal**, v.62, n.2, p.195-210, 2009.

LEE, W.J.; SANDLER, D.P.; BLAIR, A.; SAMANIC, C.; CROSS, A.J.; ALAVANJA, M.C.R. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. **International Journal of Cancer**, v.121, n.2, p.339-346, 2007.

LEVINE, P.; SIMSIR, A.; CANGIARELLA, J. Management issues in breast lesions diagnosed by fine-needle aspiration and percutaneous core breast biopsy. **American Journal of Clinical Pathology**, v.125, p.124-134, 2006.

LUCK, A. Nature and Nurture – Lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p.113-125, 2005.

Mac EWEN, E.G.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; Mac EWEN, E.G. (Eds). **Small animal clinical oncology**. 2ed. Philadelphia W.B. Saunders, 1996. p.356-372.

MANI, U.; PRASAD, A.K.; SURESHKUMAR, V.; KUMAR, P.; LAL, K.; MAJI, B.K.; DUTTA, K.K. Hepatotoxic alterations induced by subchronic exposure of rats to formulated fenvalerate (20% ec) by nose only inhalation. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.17, n.3, p.309-314, 2004.

MATOS, G.B.; SANTANA, O.A.M.; NOBRE, L.C.C. Intoxicação por agrotóxico. In: SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO. SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA E PROTEÇÃO DA SAÚDE: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. **Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador**. Salvador: CESAT/ SESAB, 2002. p.249-280.

MATOS, I.; DUFLOTH, R.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L.C.; SCHMITT, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archiv**, v.447, n.4, p.688-694, 2005.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P. Definitions and explanatory notes. In: _____. **Who histological classification of mammary tumors of the dog and cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology. 1999, p.18-27.

MURPHY, F.M.; KANG, H.; DALAGER, N.A.; LEE, K.Y.; ALLEN, R.E.; MATHER, S.H.; KIZER, K.W. The health status of Gulf War veterans: lessons learned from the Department of Veterans Affairs Health Registry. **Military Medicine**, v.164, n.5, p.327-331, 1999.

NOSSONI, F. Single-cell gel electrophoresis (comet assay): methodology, potential applications, and limitations in cancer research. **MMG 445 Basic Biotechnology**, v.4, p.30-35, 2008.

NUNES, M.V.; TAJARA, E.H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.4, p.372-383, 1998.

OKUNO, Y.; ITO, S.; SEKI, T.; HIROMORI, T.; MURAKAMI, M.; KADOTA, T.; MIYAMOTO, J. Fenvalerate-induced granulomatous changes in rats and mice. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.11, n.1, p.53-66, 1981.

OLIVE, P.L.; DURAND, R.E.; Le RICHE, J.; OLIVATTO, I.A.; JACKSON, S.M. Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. **Cancer Research**, v.53, p.733-736, 1993.

OLIVE, P.L.; TROTTER, T.; BANÁTH, J.P.; JACKSON, S.M.; Le RICHE, J. Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay. **British Journal of Cancer**, v.27, p.191-195, 1996.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P.L.F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, p.593-616, 2007.

ONU - United Nations Organization. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. **World Population Prospects: The 2008 Revision**. New York. Disponível em <<http://esa.un.org/unpp>> Acesso em 17 fev. 2011.

PARKER, C.M.; PATTERSON, D.R.; VAN GELDER, G.A.; GORDON, E.B.; VALERIO, M.G.; HALL, W.C. Chronic toxicity and carcinogenicity evaluation of fenvalerate in rats. **Journal of Toxicology Environmental Health**, v.13, n.1, p.83-97, 1984a.

PARKER, C.M.; PICCIRILO, V.J.; KURTZ, S.O.L.; GARNER, F.M.; GARDINER, I.H.; VAN GELDER, G.O.A. Six-month feeding study of fenvalerate in dogs. **Fundamental and applied Toxicology**, v.4, n.4, p.577-586, 1984b.

PARKER, E.M.; MCCULLOUGH, E.B.; GELLATLY, J.B.M.; JOHNSTON, E.D. Toxicologie and carcinogenic evaluation of fenvalerate in the B6C3Fi mouse. **Fundamental and applied Toxicology**, v.3, n.2, p.114-120, 1983.

PEREZ-MARTINZ, C.; GARCIA-IGLESIAS, M.J.; DURAN-NAVARRETE, A.J.; ESPINOSA-ALVAREZ, J.; GARCIA-FERNADES, R.A.; LORENZANA-ROBLES, N.; FERNANDEZ-PEREZ, S. Histopathological and immunohistochemical characteristics of two canine lipid-rich mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine**, v.52, n.2, p.61-66, 2005.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGEL, E.; PERGAMENCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LÜNNING, P.E.; BÜRRESEN-DALE, A.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, n.6797, p.747-52, 2000.

RHODES, C.; JONES, B.K.; CROUCHER, A.; HUTSON, D.H.; LOGAN, C.J.; HOPKINS, R.; HALL, B.E.; VICKERS, J.A. The bioaccumulation and biotransformation of *cis, trans*-cypermethrin in the rat. **Pesticide Science**, v.15, n.5, p.471-480, 1984.

RITTER, L. Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer. **Cancer**, v.80, p.2019-2033, 1997.

RUSIECKI, J.A.; PATEL, R.; KOUTROS, S.; BEANE-FREEMAN, L.; LANDGREN, O.; BONNER, M.R.; COBLE, J.; LUBIN, J.; BLAIR, A.; HOPPIN, J.A.; ALAVANJA, M.C. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. **Environmental Health Perspectives**, v.117, n.4, p.581-586, 2009.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v.6, p.5, 2010.

SCHMITT, F.C.; BENTO, M.J.; AMENDOEIRA, I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. **Diagnostic Cytopathologic**, v.13, n.4, p.347-351, 1995.

SCOOT, R.C.; RAMSEY, J.D. Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule (cypermethrin, a pyrethroid insecticide). **Journal of Investive Dermatology**, v.89, n.2, p.142-146, 1987.

SHARP, D.S.; ESKENAZI, B.; HARRISON, R.; CALLAS, P.; SMITH, A.H. Delayed health hazards of pesticide exposure. **Annual Review of Public Health**, v.7, n.441-471, 1986.

SHUKLA, Y.; ARORA, A.; SINGH, A. Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. **Toxicology**, v.163, n.1, p.1-9, 2001.

SHUKLA, Y.; YADAV, A.; ARORA, A. Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. **Cancer Letters**, v.182, n.1, p.33-41, 2002.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1994.

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

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

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v.40, n.18, p.2667-2675, 2004.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C. BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN LONNING, P.; BORRESEN-DALE, A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U S A, v.98, p.10859–10874, 2001.

SORLIE, T.; WANG, Y.; XIAO, C.; JOHNSEN, H.; NAUME, B.; SAMAHA, R.R. et al., Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses cross three different platforms. **BMC Genomics**, v.7, p.127, 2006.

STONE, T.W. Endogenous neurotoxins from tryptophan. **Toxicon**, v.30, n.1, p.61-73, 2001.

TATENO, C.; ITO, S.; TANAKA, M.; YOSHITAKE, A.; Effects of pyrethroid insecticides on gap junctional intercellular communications in Balb/c3T3 cells by dye-transfer assay. **Cell Biology and Toxicology**, v. 9, n.3, p.215-221, 1993.

TISCH, M.; SCHMEZER, P.; FAULDE, M.; GROH, A.; MAIER, H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human mucosal cells. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v.259, n.3, p.150-153, 2002.

TUCKER, S.B.; FLANNIGAN, S.A.; ROSS, C.E. Inhibition of cutaneous paresthesia resulting from synthetic pyrethroid exposure. **International Journal of Dermatology**, v.23, n.10, p.686-689, 1984.

U.S. EPA. 2007. United States Environmental Protection Agency. **Permethrin & Resmethrin (Pyrethroids)**. TEACH Chemical Summary. Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health. Disponível em: <http://www.epa.gov/teach/chem_summ/pyrethroid_summary.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2011.

VIEIRA, D.S.C.; DUFLOTH, R.M.; SCHMITT, F.C.L.; ZEFERINO, L.C. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v.30, n.1, p.42-47, 2008.

WILLIS, R.A. **The Spread of Tumors in the Human Body**. 2 ed. London: Butterworth & Co, 1952.

WOZNIAK, K.; KOLACINSKA, A.; BLASINSKA-MORAWIEC, M.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; ZADROZNY, M.; BLASIAK, J. The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. *Archives of Toxicology*, v.81, p.519-527, 2007.

YAMASAKI, H. "Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis." **Carcinogenesis**, v.11, p.1051-1058, 1990.

YAMASAKI, H.; MIRONOV, N. Genomic instability in multistage carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v.112-113, p.251-256, 2000.

YUSPA, S.H., HENNINGS, H., SAFFIOTTI, U. Cutaneous chemical carcinogenesis: past, present and future. **Journal of Investigative Dermatology**, v.67, n.1, p.199-208, 1976.

ZITO, S.W.; ZIEG, R.G.; STABA, E.J. Distribution of Pyrethrins in Oil Glands and Leaf Tissue of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. **Planta Médica**, v.47, n.4, p.205-207, 1983.

Anexos

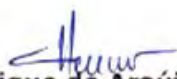
ANEXO A

**Atestado de aprovação
da comissão de ética
no uso de animais**



ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto "**Associação entre os níveis de resíduos piretróides e graus de agressividade dos carcinomas mamários espontâneos de cadelas**", Protocolo nº 42/2009-CEUA, do aluno(a) **Márcia Moleta Colodel** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 30 de setembro de 2009.


Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido



Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, RG _____, permito a participação do meu animal no experimento do projeto de pesquisa “ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE RESÍDUOS PIRETRÓIDES E GRAUS DE AGRESSIVIDADE DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS DE CADELAS” e **autorizo a colheita de material biológico** para realização de exames. Compreendo que a participação é voluntária e que **tenho o direito de não permitir**, sem que isso acarrete quaisquer prejuízos ao meu atendimento ou ao atendimento do meu animal. Informo que **estou consciente e perfeitamente esclarecido quanto aos riscos** que o procedimento trará ao cão abaixo identificado, de minha responsabilidade.

Estou ciente que os **procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal** segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e à Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008.

Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam **divulgados em publicações científicas**, desde que nem meu nome, nem o de meu animal, sejam mencionados.

Nome do animal: _____ RG _____

Raça: _____ Idade _____

Botucatu, SP, ____/____/____

Assinatura: _____ fone: _____

Testemunha 1: _____ RG: _____ fone: _____

Testemunha 2: _____ RG: _____ fone: _____

Pesquisador: _____ fone: _____

Orientador: _____ fone: _____

Documento elaborado em 2 (duas) vias, ficando uma com o proprietário e outra com o pesquisador

ANEXO C

Formulário para colheita de dados das cadelas do estudo

Projeto de pesquisa em carcinoma Mamário espontâneo de cadelas

DADOS GERAIS

Data: ____/____/____ RG: _____

Nome do animal: _____ Raça: _____ Idade: _____ Cor: _____ Peso: _____

Nome do proprietário: _____ Profissão: _____

Área residencial: _____ Cidade: _____ Fone: _____

HISTÓRICO/AVALIAÇÃO CLÍNICA

Castrada?	☐ não	☐ sim		
Ciclo estral regular?	☐ não	☐ não apresenta	☐ não sabe	☐ sim data último: _____
Já cruzou e não ficou prenha?	☐ não	☐ sim (nº de vezes: _____)		
Nº de crias	☐ nenhum	☐ um	☐ dois	☐ três ☐ mais (nº: _____)
Pseudogestação?	☐ não	☐ sim (nº de vezes: _____) data última: _____		
Aborto?	☐ não	☐ sim (nº de vezes: _____) data último: _____		
Secreção vaginal atual?	☐ não	☐ sim (coloração: _____)		
Hormônios	☐ nunca recebeu hormônio ☐ contraceptivos (nome ou tipo: _____) nº vezes que utilizou: _____ data da última dose: _____ ☐ abortivos (nome ou tipo: _____) nº vezes que utilizou: _____ data da última dose: _____ ☐ outros hormônios (nome ou tipo: _____) início do tratamento: _____ data da última dose: _____			
Ambiente onde vive	☐ dentro de casa ☐ quintal ☐ canil ☐ dentro e fora de casa			
Alimentação	☐ ração ☐ caseira ☐ ração + caseira			
Controle de ectoparasitas?	☐ não ☐ sim			
Tempo de crescimento do tumor	produto utilizado: _____ apresentação: _____ data última aplicação: _____ ☐ até 4 semanas ☐ 4-12 semanas ☐ 12- 24 semanas ☐ + de 24 semanas (tempo: _____)			
Crescimento atual do tumor	☐ lento ☐ médio ☐ rápido ☐ estável ☐ outro: _____			
Lesão tumoral prévia	☐ não ☐ sim (localização: _____)			
Emagrecimento progressivo	Cirurgia? ☐ não ☐ sim (data: _____) ☐ não ☐ sim (início: _____)			

Mama afetada	Consistência	Invasão	Ulceração	Mamilo	Secreção	Característica	Tamanho
☐ Inguinal Direita	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Inguinal Esquerda	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Abdominal caudal Direita	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Abdominal caudal Esquerda	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Abdominal cranial Direita	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Abdominal cranial Esquerda	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Torácica caudal Direita	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Torácica caudal Esquerda	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Torácica cranial Direita	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	
☐ Torácica cranial Esquerda	☐ firme ☐ macia ☐ elástica	☐ sem aderência ☐ aderido na pele ☐ aderido na musculatura	☐ sim ☐ não	☐ sem alteração ☐ ulcerado ☐ retraído ☐ eczematoso	☐ sim (tipo: _____) ☐ não	☐ sólido ☐ cístico ☐ infiltrativo	

Envolvimento de linfonodo	☐ não	☐ inguinal D	☐ inguinal E	☐ axilar D	☐ axilar E
Condição corporal	☐ boa	☐ sobrepeso	☐ obeso	☐ muito magro	☐ magro

Observações: _____

Artigo Científico

**Artigo submetido para publicação
na revista Diagnostic Patology
sob o título**

**“Spontaneous mammary carcinomas
in female dogs:**

**association between immunohistochemical
degrees of neoplasia aggressiveness and
residual pyrethroids ”**

Instructions for authors

Diagnostic Pathology

Title page

This should list the title of the article. The title should include the study design, for example:

A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial

X is a risk factor for Y: a case control study

The full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors must be included on the title page. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract; **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number, e.g. **Trial registration:** Current Controlled Trials ISRCTN73824458. Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the CONSORT extension for abstracts.

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Methods

This should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors should disclose any financial competing interests but also any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.

Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you or one of your co-authors has a competing interest, please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements and Funding

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

The role of a medical writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished data", "unpublished observations", or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow

Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the *Diagnostic Pathology* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Diagnostic Pathology reference style

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

BibTeX

EndNote style file

Reference Manager

Zotero

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon, C: **Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims**. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Microsoft Word template

Although we can accept manuscripts prepared as Microsoft Word, RTF or PDF files, we have designed a Microsoft Word template that can be used to generate a standard style and format for your article. It can be used if you have not yet started to write your paper, or if it is already written and needs to be put into *Diagnostic Pathology* style.

Download the template (Mac and Windows compatible Word 1998/2000) from our site, and save it to your hard drive. Double click the template to open it.

How to use the *Diagnostic Pathology* template

The template consists of a standard set of headings that make up a *Diagnostic Pathology* Research manuscript, along with dummy fragments of body text. Follow these steps to create your manuscript in the standard format:

Replace the dummy text for Title, Author details, Institutional affiliations, and the other sections of the manuscript with your own text (either by entering the text directly or by cutting and pasting from your own manuscript document).

If there are sections which you do not need, delete them (but check the rest of the Instructions for Authors to see which sections are compulsory).

If you need an additional copy of a heading (e.g. for additional figure legends) just copy and

paste.

For the references, you may either manually enter the references using the reference style given, or use bibliographic software to insert them automatically. We provide style files for EndNote, Reference Manager and Zotero.

For extra convenience, you can use the template as one of your standard Word templates. To do this, put a copy of the template file in Word's 'Templates' folder, normally C:\Program Files\Microsoft Office\Templates on a PC. The next time you create a new document in Word using the File menu, the template will appear as one of the available choices for a new document.

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files and should not be included in the main text of the submitted manuscript. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures,

Formats

The following file formats can be accepted:

EPS (preferred format for diagrams)

PDF (also especially suitable for diagrams)

PNG (preferred format for photos or images)

Microsoft Word (figures must be a single page)

PowerPoint (figures must be a single page)

TIFF

JPEG

BMP

CDX (ChemDraw)

TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright holder to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used. Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image). Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the document text file. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Diagnostic Pathology* does not restrict the length and quantity of data in a paper, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional information. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission process.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Any additional files will be linked into the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, at the end of the document text file:

- File name
- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data
- Additional datafiles should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See additional file 1: Movie1 for the original data used to perform this analysis'.

Formats and uploading

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
- PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
- SWF (Shockwave Flash)
- Movies
- MOV (QuickTime)
- MPG (MPEG)

- Tabular data
- XLS (Excel spreadsheet)
- CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root;
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders;
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters;
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine;
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Spontaneous mammary carcinomas in female dogs: association between immunohistochemical degrees of neoplasia aggressiveness and residual pyrethroids

Marcia Moleta Colodel^{1*}, Vera Maria Villamil Martins², Maria Denise Lopes³, Noeme Sousa Rocha¹

1 Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Paulista State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

2 Department of Veterinary Medicine, Center for Agroveterinary Sciences (CAV), State University of Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brazil.

3 Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Paulista State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

* Correspondence: mmc@fmvz.unesp.br

Serviço de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Marcia Moleta Colodel: mmc@fmvz.unesp.br

Vera Maria Villamil Martins: martinsev@terra.com.br

Maria Denise Lopes: lopes@fmvz.unesp.br

Noeme Sousa Rocha: rochanoeme@fmvz.unesp.br

Abstract

Among tumors diagnosed in female dogs, mammary neoplasias present the highest incidence. These neoplasias can be influenced by internal and external factors including environmental contaminants. Despite evidence of toxicity of pyrethroids, their cancerigenic potential remains insufficiently elucidated, thus necessitating investigation of their participation in mammary cancer. This study aimed to investigate possible relations between pyrethroid residues and spontaneous mammary carcinoma in female dogs by correlating them with neoplasia aggressiveness degree. Fifty female dogs were selected and divided into five groups of 10 animals each. The Control group was formed by female dogs that presented negative diagnosis for mammary neoplasia; the groups Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal were constituted by female dogs that presented inguinal mammary carcinoma classified immunohistochemically as Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal, respectively. The aggressiveness degree of carcinomas was evaluated by immunohistochemistry through expression of HER-2, p63 and estrogen receptor. Residual concentrations of the pyrethroids allethrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin from the mammary gland and fat tissue adjacent to the mammary gland were determined by High Efficiency Liquid Chromatography. Data were analyzed by Chi-Square test at $p \leq 0.05$ significance level. Of the 50 female dogs, six presented residues of one or more pyrethroids in mammary samples evaluated and 10 presented insecticide residues in fat tissue samples. The most frequent pyrethroid was deltamethrin. The distributions of each residue investigated among the evaluated groups and between mammary and fat tissue samples in the same animal were heterogeneous. There was no statistical evidence that pyrethroids are involved in mammary carcinoma aggressiveness in female dogs.

Introduction

Spontaneous mammary cancer is the most prevalent neoplasia among both female dogs and women [1,2]. Although, in both species, its occurrence varies with age, geography and breed or ethnicity, the incidence of this cancer is, in general, one in four among non-sterilized female dogs aged more than four years [3,4] and one in nine among women aged 50 to 69 years [5,6]. In Brazil, according to estimates from the National Cancer Institute, the number of new mammary cancer cases in 2010 was 49,240, with a risk estimated at 49 cases per 100 thousand women [7].

An immunohistochemical panel to characterize the prognosis of breast carcinomas in women is utilized routinely in laboratories of human pathology. In the immunohistochemical classification of PEROU et al. [8], breast carcinomas in women were subdivided into Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal.

The subtype Luminal A, whose phenotype is positive estrogen receptor (ER) and of negative Human Epidermal growth factor Receptor 2 - HER-2, is characterized by presenting less aggressive biological behavior. The Luminal B subtype, whose phenotype is ER positive and HER-2 positive, is characterized by moderate aggressiveness. The HER-2 Superexpression subtype, whose phenotype is ER-negative and HER-2 positive, is characterized by loss of control of cell proliferation, conferring greater aggressiveness to these tumor types in relation to luminal ones. The Basal subtype, whose phenotype is ER-negative and HER-2 negative, is characterized by greater potential for biological aggressiveness [9-11]. The subtype Basal still expresses the proteins p63 and/or cytokeratin-5 commonly present in the nucleus of progenitor or basal cells of the mammary gland [12].

Given this classification, GAMA et al. [13] and SASSI et al. [14] tested an immunohistochemical panel utilized in medicine in relation to female dog mammary

carcinomas and concluded that, similar to breast cancer in women, the canine form can be classified based on medical markers predictive of tumoral aggressiveness.

In addition to age and breed factors in dogs – as in ethnicity and age in humans with which these animals may live in close association – lifestyle, diet and environmental factors can contribute to the development of some cases of mammary cancer [15].

Currently, pyrethroids are among the environmental contaminants most utilized in agricultural and forested areas, in domiciles, public environments, in programs of public health and in the control of vectors and ectoparasites of animals, including humans [16]. In dogs, pyrethroids are used extensively against a wide gamut of ectoparasites, in different formulations, including pour-on, spray, collars, solutions, shampoos and sprays [17].

Pyrethroids can be absorbed by mammals through the digestive or respiratory system or cutaneously [17,18]. The lipophilic character of pyrethroids favors their rapid access to various tissues such as fat and those of the liver, blood, muscle and brain [19,20].

Some epidemiological data indicate that pyrethroids do not act in human carcinogenesis [21-24]. Nevertheless, other surveys have shown a relation between pyrethroids and leukemia [25], prostate cancer [26] and multiple myeloma [27]. These data signal the existence of sufficient evidence to evaluate, very carefully, the participation of these compounds in the etiology of different types of cancer in humans and well as dogs, since according to DAGLI [15] both species can share the same environment and, therefore, the same exposure conditions.

In relation to mammary cancer, the involvement of pyrethroids was studied in the etiology of mammary neoplasias in an oral carcinogenicity assay in *Sprague-Dawley* rats that received 1 to 1000 ppm of the pyrethroid fenvalerate in the diet, for two years.

Significant increases in mammary tumor incidence on the order of 51%, 57%, 70%, 65% and

55% were observed for the doses of 1, 5, 25, 250 and 1000 ppm, respectively, versus 43% in the non-treated group [28].

But in a prospective cohort epidemiological study that evaluated the risk of mammary cancer and indirect exposure to 50 specific agrottoxins among 30,454 wives of pesticide applicators, no relation was found between the 309 incidences of mammary cancer registered in the states of Iowa and North Carolina between 1993 and 2000 and the exposure to all the combined pesticides, or isolated exposure to pyrethroid insecticides. However, the researchers emphasize the need for new studies due to the small number of observed cases ENGEL et al. [29].

In light of these data and the inexistence of similar investigations in dogs, ANDRADE et al. [30] and BARIANI and ROCHA [31] researched the deposition of pyrethroids in the fat tissue adjacent to malignant mammary neoplasias of nine and 30 female dogs, respectively. Chromatographic analysis of the samples detected the presence of the pyrethroids allethrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin in three [30] and 16 [31] female canine carriers of mammary neoplasias. The important results obtained by these researchers indicate the need to pursue more detailed studies to verify the influence of this insecticide on the genesis and aggressiveness of mammary cancer in female dogs.

Since canine spontaneous mammary neoplasias present various epidemiological, clinical, biochemical and biological characteristics that are similar to those found in humans [2,15] and given that the two species share the same environment [15], new and more detailed studies of female dogs could provide a comparative model to help elucidate the various aspects of breast carcinogenesis in women.

The present study aimed to identify possible relations between residues of pyrethroids and spontaneous mammary carcinoma in female dogs by correlating them with the immunohistochemical aggressiveness degree of the neoplasia.

Material and methods

This study was conducted according to the Ethical Principles in Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee of FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, under protocol number 42/2009. The inclusion of the animals was contingent upon authorization by the owners by means of signing terms of free and clear consent, after being informed about the experimental protocol.

At the Small Animal Clinical Surgery Service and Animal Reproduction Service FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, 50 female dogs, aged between seven and 12 years, were selected without predilection for breed; they all presented cytopathological diagnosis of carcinoma of the inguinal mammary gland. Also utilized were 10 healthy female dogs that had been sent to the sterilization program at the Animal Reproduction Service of FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, and presented negative clinical diagnosis for mammary neoplasia.

After local antisepsis, the mammary gland lesions of the female dogs with neoplasia were punctured with a disposable needle, l 26G 1/2, to obtain a preliminary characterization of the enlarged masses as malignant neoplasias of mammary origin. The samples obtained were distended onto histological slides, fixed in methanol p.a. (Merck, Darmstadt, Germany) and stained in May-Grünwald Giemsa for morphological characterization and fixed in ethanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany) for staining by the Papanicolau method in order to evaluate their characteristics of cellular malignity. Subsequently, they were analyzed under a light microscope (ZEISS – I Model AXIO Imager

A1). The cytopathological malignancy criteria were those specified by ALLEN et al. [32] and adopted by the Pathology Service at FMVZ/UNESP/Botucatu/SP.

For the anatomohistopathological analysis one fragment of tumoral mass (1 cm²) was collected from each of the 50 female dogs with mammary neoplasia submitted to partial or radical mastectomy and one inguinal mammary gland was collected from each of the female dogs without a mammary tumor during the elective ovariosalpingohysterectomy procedure. Each collected fragment was fixed in 10% buffered formalin, routinely processed for histopathology and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) at the Pathology service of FMVZ/UNESP/Botucatu/SP. From each cut the slide quality was verified, the neoplasia was classified and the location was chosen for collection of the cylinders subsequently evaluated by tissue microarray. The reading of the slides was accomplished in a light microscope (ZEISS – I Model AXIO Imager A1) following the criteria of tumor classification according to cellular composition adopted by the World Health Organization [33].

From the cuts stained with HE, the areas of interest for the immunohistochemical study of the samples were marked on the slides and identified in the donor blocks. In the Pathological Anatomy Service at the A.C. Camargo Hospital /Sao Paulo/SP, the areas identified in donor blocks from the 50 female dogs with mammary carcinoma were removed and transferred to two receptor blocks. In each case two cylinders 2 mm in diameter were removed from two distinct areas of the tumor. In each receptor block were also included samples of non-neoplastic mammary gland as a control and one sample of normal placenta tissue to orient the block. TMAs were constructed by utilizing the *Tissue MicroArray Builder* 20010.2, Histopathology Ltd, Hungary. After the construction, 3 µm sections were cut and attached to positive charged histological slides (*Positive charged adhesion slides*, Amitel, Brazil), paraffinized and stored at -20 °C until their utilization in immunohistochemical reactions. One section from each receptor block was stained in HE

and reviewed to confirm the presence of morphological areas representative of the original lesions.

The samples contained on the TMA slides were submitted to immunohistochemical reaction following the standard protocol in the Investigative Pathology Laboratory and Compared with the Pathology Service at FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, utilizing the antibodies RE α (clone 6F11, dilution 1:25 - Novocastra Laboratories, UK), HER-2 (polyclonal, dilution 1:2000 - Dako, USA) and p63 (4A4, dilution 1:150 - Dako, USA). For this, after being paraffinized and rehydrated, the samples were submitted to antigen retrieval using Citrate pH 6.0 in a microprocessor-controlled Pascal pressure chamber (Dako, EUA) for 30 seconds at 125 °C. Next, the material was incubated with 3% hydrogen peroxide diluted in methanol, for 30 minutes in a dark chamber, and subsequently washed with Tris EDTA buffer pH 7.4. In sequence, the samples were incubated with *Protein Block* (Novocastra Laboratories, Newcastle, England) for 10 minutes, at ambient temperature and washed with Tris EDTA buffer pH 7.4. Subsequently they were incubated with primary antibodies diluted in *IHC diluent solution* (Novocastra Laboratories, Newcastle, England) and applied on sections for incubation overnight at 4 °C. To amplify the signal and to reveal a chromogenic solution of liquid 3,3' diaminobenzidin (DAB) (Dako, Carpinteria, USA), a system based on the polymer *NovoLink* was utilized (Novocastra Laboratories, Newcastle, England). The sections were counterstained with Harris hematoxylin and dehydrated; then the slides were mounted with coverslips and read with the aid of Permount mounting medium.

The slides were read in a light microscope (ZEISS – I Model AXIO Imager A1) following the prior mapping of TMAs and for each marker a semiquantitative gradation was utilized to evaluate the immunohistochemistry results. The RE α colorations were considered positive when nuclear staining was observed in more than 10% of cells, as established by

SCHMITT et al. [34]. Staining intensity gradations for HER-2 were established by optical analysis based on a graduated Hercep Test[®] scoring system (0: negative, 1+: negative, 2+: slightly positive, 3+ strongly positive). The results were considered positive when the tissue was classified as 2+ or 3+. The p63 colorations were considered positive when there was nuclear staining [35] in more than 10% of neoplastic cells.

Based on the data obtained from immunohistochemical reactions, the samples from the 50 female dogs were randomly distributed into five groups of 10 animals each. The Control group was formed by female dogs that presented negative clinical and histopathological diagnoses for mammary neoplasia; the group Luminal A was composed of the female dogs that presented mammary carcinoma classified by immunohistochemistry as Luminal A (ER positive, HER-2 negative and p63 negative); the group Luminal B was constituted by bitches that presented mammary carcinoma immunohistochemically classified as Luminal B (ER positive, HER-2 positive and p63 negative); the HER-2 Superexpression group formed by female dogs with mammary carcinoma classified by immunohistochemistry as HER-2 Superexpression (ER negative, HER-2 positive and p63 negative); and the Basal group comprised the bitches that presented mammary carcinoma immunohistochemically classified as Basal (ER negative, HER-2 negative and p63 positive). The number of animals in each age group was similar among the five groups; and all the female dogs selected resided in an urban environment, had access to the interior of the owner's residence, were fed commercial ration and homemade food, were never treated with hormone therapy and had never been submitted to topical treatment with pyrethroids for at least 60 days.

For the toxicological exam, 5g of neoplastic tissue and 5g of normal inguinal mammary tissue were collected during the mastectomy surgical procedure (female dogs with mammary carcinoma) and elective ovariosalpingohysterectomy (female dogs without any

mammary tumor), respectively. Also collected was 5g of fat tissue adjacent to the excised mammary gland from all bitches from all groups. The fragments obtained were maintained under refrigeration at the temperature of -4 °C until the toxicological analysis performed by *High-Performance Liquid Chromatography- HPLC*, according to the method described by BISSACOT and VASSILIEFF [36], adapted for the quantitative determination of pyrethroid residue concentrations in samples of mammary and fat tissue. Both tissues from the 50 female dogs selected were processed for extraction of active principles allethrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin according to the criteria utilized at the Toxicological Assistance Center (CEATOX) of the Institute of Biosciences/UNESP/Botucatu/SP.

Both the frequency of residues and the association between the presence of pyrethroids in mammary gland and fat tissue in female dogs with mammary carcinoma were evaluated by the Chi-Square test (χ^2), for which the data were organized into a contingency table, adopting a significance level of $p \leq 0.05$ [37].

Results

The staining of mammary carcinoma cells from female dogs in this study by RE α (Fig. 1) and p63 (Fig. 2) revealed the typical nuclear coloration pattern, while staining by antibody HER-2 was cytoplasmic (Fig. 3).

Among the mammary samples from the 50 bitches evaluated in this experiment, 44 did not show pyrethroid residues while six (12%) presented residues of at least one pyrethroid (Table 1). The χ^2 test found no association between the pyrethroid presence in the mammary tissue and carcinoma occurrence in different immunohistochemical degrees of malignancy ($p > 0.05$)

Pyrethroids were not present in the fat tissue of 40 (80%) out of the 50 female dogs in this study, (Table 2). The χ^2 test showed no association between pyrethroid presence in fat tissue versus carcinoma occurrence in the different immunohistochemical malignancy degrees ($p>0.05$).

Among the 100 samples analyzed (50 from breast and 50 from fat tissue), although the relation between the residue levels of each of the pyrethroids investigated and immunohistochemical phenotype of carcinomas was not significant ($p=0.3365$) by the χ^2 test (calculated $\chi^2 = 13.46$), it was observed that the most frequent residue was deltamethrin, which was detected in seven of the female dogs (one from the Control group and two in each of the groups Luminal A, Luminal B and HER-2 Superexpression). The second most commonly found pyrethroid was cypermethrin followed by allethrin (Fig. 4).

The quantities of each pyrethroid residue investigated (in $\mu\text{g/g}$) were heterogeneously distributed among the groups evaluated and between the mammary and fat tissue samples in the same animal (Table 3).

Discussion

Evaluating the gene expression of breast neoplasias in women, generally by a technique such as TMA, enables the taxonomic identification of distinct carcinoma subtypes including: Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal [8]. These molecular subtypes not only reflect the heterogeneity of mammary carcinomas but also aid in the prognosis of these neoplasias; for example, the subtype Luminal A is associated with a better therapeutic response, whereas, to the contrary, the Basal subtype is associated with more aggressive behavior and a poorer response to treatment [9-11]. In canine mammary neoplasias, the loss of hormonal receptors in tumoral progression, as well as HER-2 Superexpression in malignancies, have also permitted the molecular classification of

carcinomas into subgroups and correlation with the prognosis, similar to human breast cancer [13,14].

This scenario, in which distinct genetic groups are translated by the immunohistochemical phenotypes themselves, is proposed in the present study to identify and quantify residues of pyrethroids in spontaneous mammary carcinoma in female dogs by correlating them with the immunohistochemical aggressiveness profile of these neoplasias. The presence of pyrethroid residues had already been detected in the fat adjacent to neoplastic mammary in female dogs [30,31]; however, to the best of our knowledge, assays that seek to evidence pyrethroid residues in the tumoral tissue itself are inexistent in the literature. Furthermore, no study was found that aims to relate these insecticides to aggressiveness immunophenotypes of neoplasia.

In the present experiment, residues of the pyrethroids allethrin, cypermethrin, deltamethrin and tetramethrin were detected not only in some samples of fat tissue adjacent to non-neoplastic and neoplastic mammary but also in non-neoplastic and neoplastic mammary tissue itself; but the presence, type and quantity of the researched pyrethroids were not associated with the immunohistochemical profile of carcinoma aggressiveness.

However, if it is considered that pesticide use is greater in a rural context [16], that in dogs the skin is an important route of contact with pyrethroids [17] and that the residues of this insecticide are eliminated from the fat tissue within an average of one month after a exposure [20,21], the lack of statistical association observed in this study may have occurred because all the female dogs utilized resided in an zone urban and had not received pyrethroid cutaneously for at least 60 days. Therefore, the results may have been underestimated since in this time a majority reduced the degree of exposure to the residues investigated.

On the other hand, given that all the animals in the present research had access to the interior of the residences of their respective owners and received a mixed diet (commercial ration and homemade foods), the presence of pyrethroid residues in fat tissue and/or in mammary tissue demonstrates the influence of the environment on the contamination of these animals since, currently, these pesticides are widely used within and near the human home environment to control insects [16], especially deltamethrin and cypermethrin, the insecticides most detected in the female dogs of the present experiment. In addition, diet may be involved in this context, given that in these animals, the oral route is also an important means of exposure to pyrethroids [17].

In most of the published studies, pesticides are quantified in only one component, namely blood/serum or tissue. In the present study, we opted to analyze the exposure by quantifying the residues of pyrethroids in the mammary and in the fat tissue adjacent to normal or neoplastic mammary gland based on the conceptual premise that the mammary gland, in this case, might be the focus of the insecticide's action while the fat tissue would be the reservoir of the fat-soluble compound, and thus can supply information on the exposure history of the animals submitted to the assay. Furthermore, avail himself, based on the evaluation of the indices of pyrethroids in mammary fat tissue and in the mammary gland itself of the same female dog, it would be an unusual situation and may provide data for comparison of the tissue distribution of this insecticide.

In fact, it was observed that only fourteen bitches in this experiment presented pyrethroid residues in mammary and /or fat tissue, two of which presented residues of more than one of the pyrethroids investigated, but in female dogs that presented residues, heterogeneity was observed in the distribution and probably in the velocity of elimination of these insecticides between the mammary and fat tissue samples in the same animal. This finding reinforces the hypothesis demonstrated by CRAWFORD et al. [19] that there is

tissue variation in the metabolism of this insecticide. Nevertheless, the metabolic differences in the pyrethroids between the observed mammary and fat tissue, and their clinical significance, need to be investigated more precisely since the detection of pyrethroid residues in neoplastic tissue is an inedited data and the kinetics of the insecticide in this tissue remains unknown.

The International Agency for Research on Cancer (IARC) includes pyrethroids, especially deltamethrin and cypermethrin, in the risk level Group 3 [38], in other words, they are not classified as carcinogenetic in humans, whereas the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) classifies permethrin and resmethrin as probably cancerigenic to humans (Group 2) [39]. Although the pyrethroids are classified, in some situations, as non-cancerigenic, there is substantial evidence for the carcinogenicity of these compounds, both in humans [25-27] and in other animals [40,41].

Thus, it is important to emphasize that the same precautions indicated for the use of substances already recognized as cancerigenic must be adopted for the utilization of pyrethroids. But it is difficult to infer that cancer can present a long period of latency and it is related to exposure to a specific pesticide, even though this relationship was not observed in this study. New studies must be encouraged, principally on mammary cancer, an area in which prior publications that sought a link between this particular type of cancer and pyrethroids [28,29] are scarce and contradictory.

Conclusion

Under the proposed experimental conditions and the sample selected for the present study, it was possible to conclude that there is no statistical evidence that pyrethroids are involved in the aggressiveness of mammary carcinomas in female dogs. Nevertheless, it is necessary to: a) study the kinetics of pyrethroids in normal and neoplastic mammary gland

and to compare the results with the kinetics of other tissues, principally fat tissue, to evaluate whether the tissue variations may represent some risk for mammary carcinogenesis; b) investigate, from the pre-established protocols, whether the concentrations of pyrethroids differ at distinct immunohistochemical degrees of mammary-carcinoma aggressiveness in female dogs.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Contributions of the authors

MMC participated in the conception, clinical investigation and sample collection of the study, performed the analysis and interpretation of the results and aided in the writing of the manuscript. VMVM participated in the conception do study and helped write the manuscript. MDL participated in the clinical investigation and collection of samples. NSR took part in the conception of the study, contributed to the preparation of the manuscript, and is the supervisor responsible for the research and review of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP and CAPES for financial support.

References

1. Cameron HL, Foster WG: **Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice.** *Phos one* 2009, **4**:1-8.
2. Klopfleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD: **Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles.** *BMC Cancer* 2010, **10**:618.

- 371
- 372 3. Fanton JW, Withrow SJ: **Canine mammary neoplasia: an overview.** *California*
373 *Vet*, 1981;7, 12-6.
- 374
- 375 4. Mac Ewen EG, Withrow SJ: **Tumors of the mammary gland.** In: *Small Animal*
376 *Clinical Oncology*. 2nd edition. Edited by Withrow SJ, Mac Ewen EG. Philadelphia: W.B.
377 Saunders; 1996:356-72.
- 378
- 379 5. Canadian Cancer Society, Statistics Canada, Provincial/Territorial Cancer Registries,
380 Public Health Agency Of Canada. **Canadian cancer statistics** 2009.
381 [<http://www.cancer.ca/canada-wide/about%20cancer/cancer%20statistics>].
- 382
- 383 6. Australian Institute Of Health And Welfare & Australasian Association Of Cancer
384 Registries 2010. **Cancer in Australia 2010: an overview.** *Cancer series n° 60. Cat. n°*
385 *CAN 56*. Canberra: AIHW.
- 386
- 387 7. Brasil. Ministério Da Saúde. **Instituto Nacional De Cancer. Estimativa 2010:**
388 **incidence de cancer no Brasil.** *Rio de Janeiro: INCA* 2009:
389 [<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>].
- 390
- 391 8. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR,
392 Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge E, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX,
393 Lønning PE, Børresen-Dale A, Brown PO, Botstein D: **Molecular portraits of human**
394 **breast tumours.** *Nature* 2000;**406**,747-52.
- 395
- 396 9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB,
397 Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein
398 Lønning P, Børresen-Dale AL: **Gene expression patterns of breast carcinomas**
399 **distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**,
400 10859–74.
- 401
- 402 10. Sorlie T: **Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct**
403 **disease entities.** *Euro J Cancer* 2004;**40**, 2667-75.
- 404
- 405 11. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Børresen-Dale A:
406 **Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast**
407 **cancer: gene expression analyses cross three different platforms.** *BMC Genomics*
408 2006;7, 127.
- 409
- 410 12. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F: **p63, cytokeratin 5,**
411 **and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast**
412 **carcinomas.** *Virchows Arch* 2005;**447**, 688-94.
- 413
- 414 13. Gama A, Alves A, Schmitt F: **Identification of molecular phenotypes in canine**
415 **mammary carcinomas with clinical implications: application of the human**
416 **classification.** *Virchows Arch* 2008;**453**,123-32.
- 417

14. Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G: **Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry.** *BMC Vet Res* 2010;**6**, 5.
15. Dagli MLZ: **The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook.** *Vet J* 2008;**177**, 3-5.
16. Barlow SM, Sullivan FM, Lines J: **Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria.** *Food Chem Toxicol* 2001;**39**, 407-22.
17. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA: **Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine.** *Vet J* 2009;**182**, 7-20.
18. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML: **Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment.** *Toxicol* 2002;**171**, 3-59.
19. Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH: Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. **Balance and tissue retention study.** *J Agric Food Chem* 1981;**29**, 130-135.
20. Appel KE, Gericke S: **Zur Neurotoxizität und toxikokinetik von pyrethroiden.** *Bundesgesundheitsblatt*, 1993;**6**, 219-28.
21. Alavanja MCR, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch CF, Knott C, Knott C, Barker J, Hoppin JÁ, Sandler DP, Coble J, Thomas K, Blair A: **Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort.** *Am J Epidemiol* 2004;**160**, 876-85.
22. Lee WJ, Sandle, DP, Blair A, Samanic C, Cross AJ, Alavanja MCR: **Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study.** *Int J Cancer* 2007;**121**, 339-46.
23. Andreotti G, Freeman LE, Hou L, Coble J, Rusiecki J, Hoppin JÁ, Silverman DT, Alavanja MC: **Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort.** *Int J Cancer*, 2009;**124**, 2495-500.
24. Dennis LK, Lynch CF, Sandler DP, Alavanja MCR: **Pesticide Use and Cutaneous Melanoma in Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study.** *Environ Health Perspect* 2010;**118**, 812-7.
25. Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor DP, Schuman LM, Burmeister LF, Van Lier SF, Dick F: **Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota.** *Cancer Res* 1990;**50**, 6585-91.
26. Alavanja MCR, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JÁ, Barker J, Coble J, Sandler DP, Blair A: **Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort.** *Am J Epidemiol* 2003;**157**, 800-14.

27. Rusiecki JÁ, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, Coble J, Lubin J, Blair A, Hoppin JÁ, Alavanja MC: **Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study.** *Environ Health Perspect* 2009;**117**, 581-6.
28. Parker CM, Patterson DR, Van Gelder GA, Gordon EB, Valerio MG, Hall WC: **Chronic toxicity and carcinogenicity evaluation of fenvalerate in rats.** *J Toxicol Environ Health* 1984;**13**, 83-97.
29. Engel LS, Hill DA, Hoppin JÁ, Lubin JH, Lynch CF, Pierce J, Samanic C, Sandler DP, Blair A, Alavanja MCR: **Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study.** *Am J Epidemiol* 2005;**161**, 121-35.
30. Andrade FHE, Figueiroa FC, Bersano PRO, Bissacot DZ, Rocha NS: **Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants.** *Diagn Pathol* 2010;**5**, 45.
31. Bariani MH, Rocha NS: **Residues of pyrethroids in the adipose tissue adjacent to spontaneous mammary carcinoma in female dogs.** *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 2010;**anoVIII**, n.15.
32. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA: **Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors.** *Vet Pathol* 1986;**23**, 649-55.
33. Misdorp W, Else RW, Hellman E, Lipscomb TP: **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.** *Armed Forces Institute of Pathology Washington* 1999, 7:58.
34. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I: **Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations.** *Diagn Cytopathol* 1995, **13**:347-351.
35. Bhargava R, Esposito NN, Dabbs DJ: **Immunohistology of the breast.** In *Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic applications*. Edited by Dabbs DJ. Philadelphia: Saunders; 2010:763-819.
36. Bissacot DZ, Vassilieff I: **HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin and cyhalothrin residues in milk and blood of lactating dairy cows.** *Jour Anal Toxic* 1997;**21**, 397-402.
37. Snedecor GW, Cochran WG: *Statistical methods*. 8. ed. Ames: Iowa State University Press; 1994.
38. International Agency For Research Cancer – IARC: **Overall evaluations of carcinogenicity to humans.** IARC 2005:
[<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-10.pdf>]
39. United States Environmental Protection Agency - U.S. EPA: **Permethrin & Resmethrin (Pyrethroids). TEACH Chemical Summary. Toxicity and Exposure**

Assessment for Children's Health. U.S. EPA 2007:

[http://www.epa.gov/teach/chem_summ/pyrethroid_summary.pdf]

40. Cabral JRP, Galendo D, Laval M, Lyandrat N: **Carcinogenicity studies with deltamethrin in mice and rats.** *Cancer Letters* 1990;**49**, 147-52.

41. Deguchi Y, Yamada T, Hirose Y, Nagahori H, Kushida M, Sumida K, Sukata T, Tomigahara Y, Nishioka K, Uwagawa S, Kawamura S, Okuno Y: **Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation.** *Toxicol Sci*, 2009;**108**, 69-80.

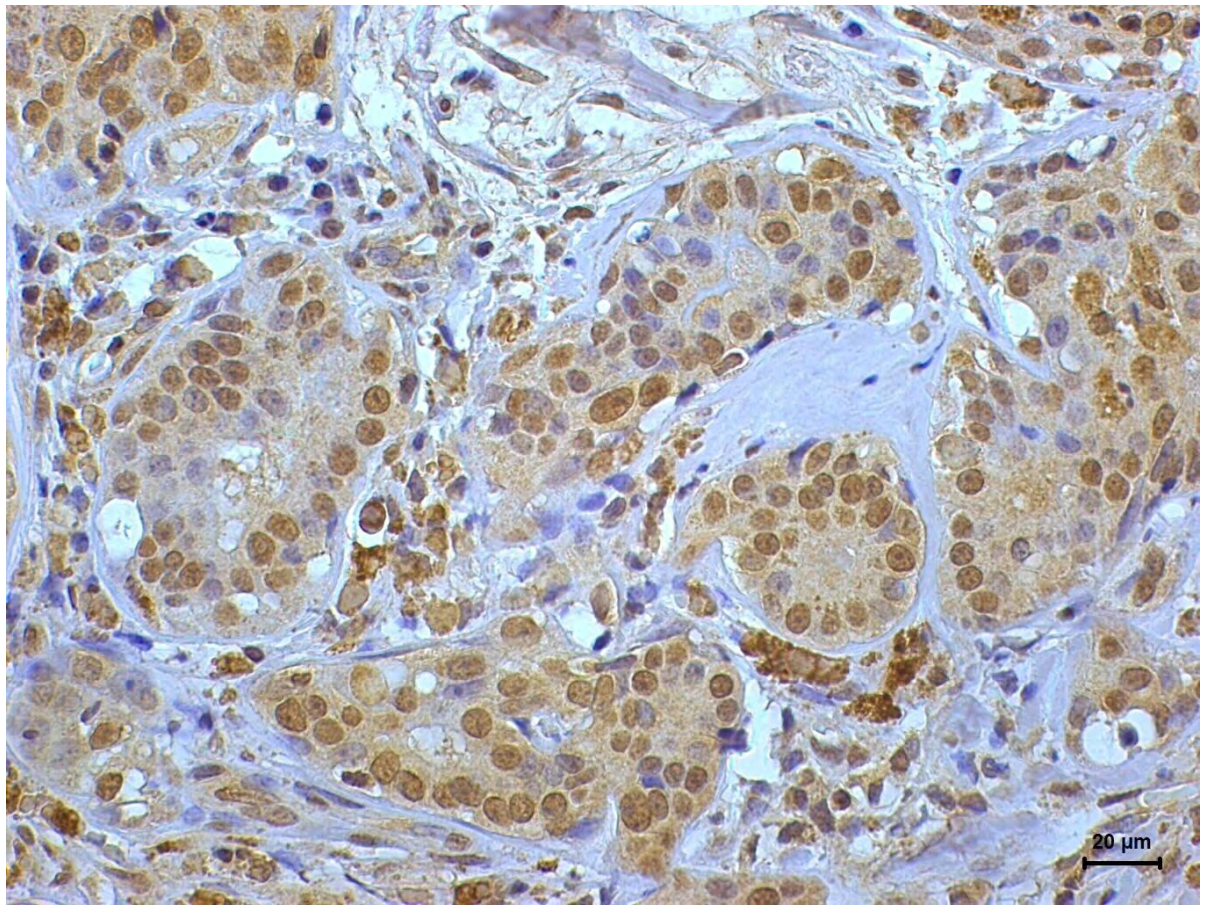


Figure 1. Immunoexpression of estrogen- α receptor in breast carcinoma from a female dog. Nuclear staining in neoplastic cells (immunoreactivity in more than 10% of neoplastic cells). (DAB, NovoLink, counterstaining with Harris hematoxylin).

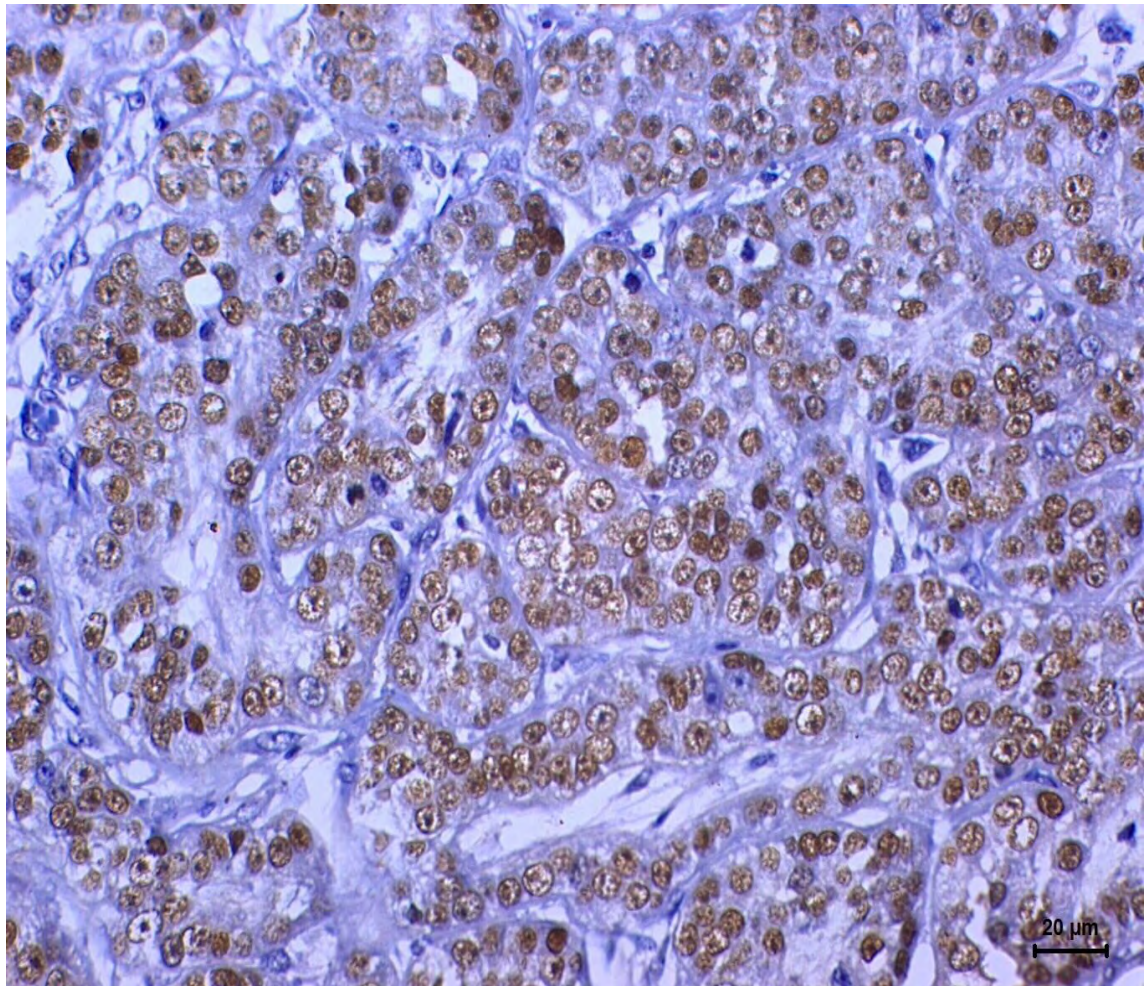


Figure 2. Immunoexpression of p63 in female dog breast carcinoma. Positive nuclear staining in neoplastic cells. (DAB, NovoLink, counterstaining with Harris hematoxylin).

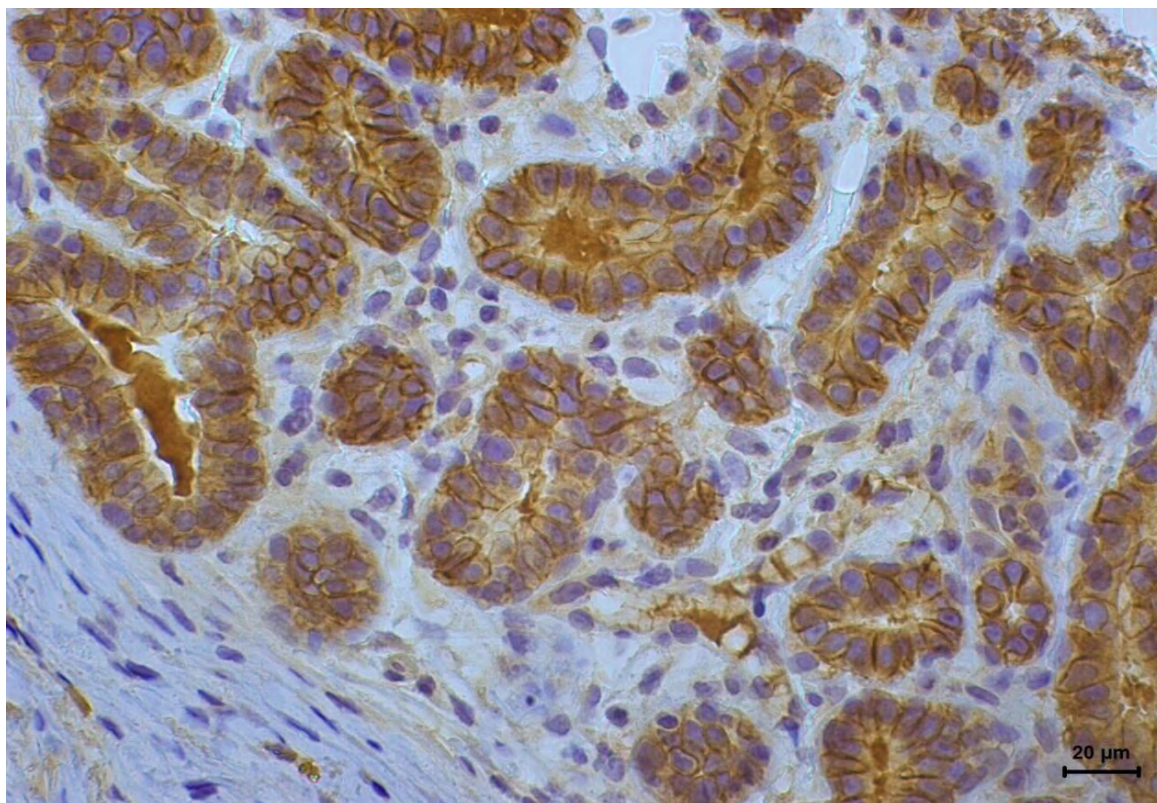


Figure 3. Immunoexpression of HER-2 in female dog mammary carcinoma. Positive staining 3+ (strongly positive); complete staining of the membrane. (DAB, NovoLink, counterstaining with Harris hematoxylin).

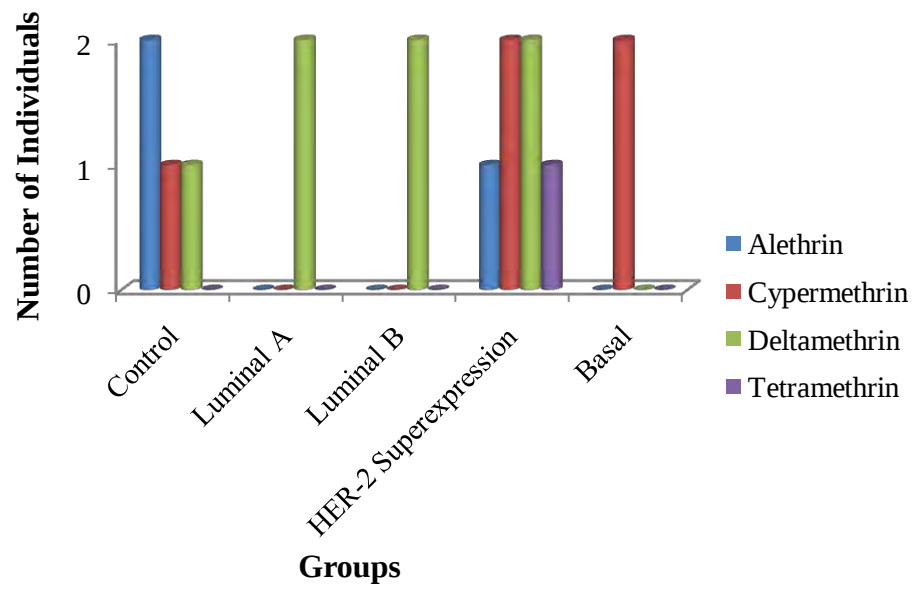


Figure 4. Identification of each pyrethroid investigated in breast and fat tissue adjacent to normal breast (Control group) and of mammary carcinomas (groups Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal) in female dogs.

Table 1. Frequencies of residues of pyrethroids in normal breast (Control group) and in breast carcinomas (groups Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal) in female dogs.

Groups	Pyrethroid Residues		n
	Absence	Presence	
Control	9	1	10
Luminal A	8	2	10
Luminal B	8	2	10
HER-2 Superexpression	9	1	10
Basal	10	0	10
Total	44	6	50
p=0.6177			
Calculated $\chi^2 = 2.652$			

Table 2. Frequencies of residues of pyrethroids in fat tissue adjacent to normal breast (Control group) and in breast carcinomas (groups Luminal A, Luminal B, HER-2 Superexpression and Basal) in female dogs.

Groups	Residues of pyrethroids		n
	Absense	Presence	
Control	7	3	10
Luminal A	10	0	10
Luminal B	9	1	10
HER-2 Superexpression	6	4	10
Basal	8	2	10
Total	40	10	50
p=0.1812			

Calculated $\chi^2 = 6.25$

Table 3. Quantification (in µg/g) of each pyrethroid investigated in breast and in fat tissue adjacent to normal breast (Control group) and of breast carcinomas (groups Luminal A, Luminal B, Superexpression of HER-2 and Basal) from 50 female dogs.

Control		Luminal A		Luminal B		Superexpression de HER-2		Basal	
Breast	Fat Tissue	Mama	Fat Tissue	Breast	Fat Tissue	Breast	Fat Tissue	Breast	Fat Tissue
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	nd	0.02 ^D	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.99 ^C
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.68 ^C
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.20 ^A	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1.23 ^A	0.47 ^A	nd	nd	0.17 ^D	0.02 ^D	nd	nd	nd	nd
0.12 ^D	nd	0.09 ^D	nd	nd	nd	nd	0.30 ^C	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.18 ^D	nd	nd
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.25 ^C	nd	nd
nd	0.93 ^A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
nd	0.15 ^C	nd	nd	0.97 ^D	nd	0.30 ^D	0.93 ^T	nd	nd

Detection limit = 0.001 µg/g

nd = not detected

A = Allethrin; C = Cypermethrin; D = Deltamethrin; T = Tetramethrin

