

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

ALICE RIBEIRO DE OLIVEIRA LIMA ALBUQUERQUE

EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC)

**ILHÉUS – BAHIA
2010**

ALICE RIBEIRO DE OLIVEIRA LIMA ALBUQUERQUE

EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC)

Dissertação apresentada, para obtenção do título de mestre em Ciência Animal, à Universidade Estadual de Santa Cruz
Área de concentração: Cancerologia
Orientadora: Profa. Dra. Roueda Abou Said

**ILHÉUS – BAHIA
2010**

ALICE RIBEIRO DE OLIVEIRA LIMA ALBUQUERQUE

EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC)

Ilhéus-BA, 28/05/2010

Roueda Abou Said – Dra
UESC
(Orientadora)

Fabiana Lessa Silva – Dra
UESC

Maria Lúcia Zaidan Dagli – Dra
USP

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu esposo que, sob todas as circunstâncias, me apoiaram e guiaram nessa jornada trilhada, dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus pela sabedoria no aprendizado, paz nos trabalhos e conforto nas atribuições.

À Prof. Dra. Roueda Abou Said, pela orientação, amizade e apoio.

À minha mãe Dilcemar, meu esposo Alberto e demais familiares, pela paciência e confiança.

Aos amigos Cláudia, Renata, Fábio, Lorena, Nancy, Milena, Danielle, Valter, Manuella, Luciana, Roberta e muitos outros que se dedicaram direta e indiretamente para o sucesso do trabalho; e a Josete, Merçon, Joílton, Mariângela e Marcelo que me apoiaram e confiaram na minha capacidade.

Aos funcionários Givaldo, Angelita, Karem, Fabiana, Valter, Márcia, D. Maria, Wanessa, Ivo e demais que me ajudaram prontamente a completar cada etapa no trabalho no Hospital Veterinário da UESC.

Aos professores George Albuquerque, Amauri Wenceslau, Fabiana Lessa, Sérgio Oliveira, Fernando Faustino, Rosilene Aparecida, Luís Gustavo Braga, José Augusto Azevedo, Rosana Clark, Alexandre Dias Munhoz, Christiano Midlej, Sérgio Nogueira, Selene Nogueira que compartilharam sua experiência e sabedoria a todos os momentos, e se disponibilizaram sempre para me orientar nas dificuldades.

Ao apoio financeiro da agência FAPESB, como bolsa de mestrado.

À empresa Pedigree® pelo alimento fornecido aos animais durante o projeto.

À farmácia de manipulação Viapharma, pela elaboração das cápsulas fornecidas aos animais durante o projeto.

EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTc)

RESUMO

O uso de produtos derivados de plantas desperta interesse, especialmente em relação à descoberta de terapias antineoplásicas, utilizadas de forma isolada ou de forma complementar aos quimioterápicos. Neste sentido, produtos como a folha da gravioleira (*Annona muricata* L.), e seus componentes, estão sob avaliação, sobretudo em decorrência do seu uso tradicional, em casos de neoplasias em humanos. Baseados no seu uso na medicina tradicional, já foram realizados diversos estudos *in vitro* avaliando o efeito citotóxico desta planta em linhagens celulares tumorais. Além da avaliação em cultura celular, a citotoxicidade da *Annona muricata* L. pode ser investigada mediante o Teste de Letalidade da *Artemia salina*, que é amplamente utilizado para avaliação de propriedades farmacológicas e tóxicas de produtos derivados de plantas. Ensaio de citotoxicidade podem ser utilizados como uma avaliação preliminar sobre o efeito antineoplásico das substâncias. Entretanto, para validação deste efeito, é necessária a realização de estudos *in vivo*, empregando modelos que reproduzam ao máximo o comportamento biológico das neoplasias. Neste sentido, o tumor venéreo transmissível canino (TVTc), uma neoplasia mesenquimatosa, pode ser utilizado como modelo experimental para avaliação de substâncias antineoplásicas, por acometer um grande número de cães, se desenvolverem como neoplasias externas (genitália), possuindo fácil acesso para avaliação e monitoramento e por ser naturalmente adquirido. Considerando o potencial terapêutico da *Annona muricata* L., realizou-se uma revisão bibliográfica sobre seu uso como agente antineoplásico pela medicina tradicional e as evidências científicas sobre o tema, sendo também abordados os assuntos teste de letalidade da *Artemia salina* e TVTc, por serem estes modelos empregados para a avaliação da citotoxicidade e da atividade antineoplásica de produtos naturais.

Palavras chave: graviola; câncer; fitoterapia; plantas medicinais

EFFECTS OF THE GRAVIOLEIRA'S LEAVES (*ANNONA MURICATA* L.) AS A COMPLEMENTARY/ALTERNATIVE THERAPY TO VINCRISTINE SULPHATE, IN CASES OF CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR (TVTc)

ABSTRACT

The use of products derivative from plants brings the attention especially on the discovery of new antineoplastic therapies or those which can be used associated with the chemotherapies. Based on this, the leaves of *Annona muricata* L., and their components, are under investigation because of their traditional uses on cancer human's cases. Based on the use of *Annona muricata* L. in traditional medicine, it has been done several studies *in vitro* assessing the cytotoxic effect of this plant on tumoral cell lines. Despite the assay on cell lines, the cytotoxicity of *Annona muricata* L. can be evaluated by the Lethality Test of *Artemia salina*, which is widely used to study of the pharmacological and toxic proprieties of products from plants. Cytotoxicity assays can be performed as a preliminary evaluation of these substances' antineoplastic effect. However, to validate this effect, it is necessary to perform the studies *in vivo*, using models that can reproduce the conditions of natural occurrence. Therefore, the canine transmissible venereal tumour (TVTc), a mesenchymal neoplasia of natural occurrence, can be used as an experimental model to evaluate the antineoplastic substances, because it affects a large number of dogs, develop itself as a external mass (genitalia), with an easy access and monitoring, and because it has a natural occurrence. Considering the therapeutical potential of *Annona muricata* L. it has been done a bibliographic review about its use as an antineoplastic agent by the traditional medicine and the scientific evidences on this issue. On this review it has been considered the Lethality test of *Artemia salina* and the canine transmissible venereal tumour (TVTc) issues too, once they were the models used to assessment of the cytotoxicity and antineoplastic activity of natural products.

Keywords: graviola, cancer, phytotherapy, medicinal plants

LISTA DE ABREVIATURAS

TVTc	Tumor Venéreo Transmissível Canino
ACGs	Acetogeninas
AZT	3'-azido-3'-deoxitimidina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
DL ₅₀	Dose letal
mg/m ²	Miligramas por metro quadrado
mg/Kg	Miligramas por quilo
mm	milímetro
mg/mL	miligramas por mililitro
µg/mL	microgramas por mililitro
g	grama

SUMÁRIO

	Resumo	v
	Abstract	vi
	Lista de abreviaturas	vii
1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Acetogeninas anonáceas	13
2.2	Alcalóides	15
2.3	Flavonóides	16
2.4	Outras atividades terapêuticas	16
2.5	Toxicidade das acetogeninas anonáceas e alcalóides	16
2.6	Ensaio Biológico	17
2.7	Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTc	18
2.7.1	Comportamento e apresentação clínica do TVTc	20
2.7.2	Resposta imune	23
2.7.3	Diagnóstico	23
2.7.4	Tratamento	25
3	EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (<i>Annona muricata</i> L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTC	28
	Resumo	28
	Abstract	29
3.1	INTRODUÇÃO	30
3.2	MATERAIS E MÉTODOS	31
3.2.1	Aquisição e armazenamento das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	31
3.2.2	Cápsulas com a folha da <i>Annona muricata</i> l. desidratada	31
3.2.3	Dose da <i>Annona muricata</i> L.	31
3.2.4	Extratos hidroalcoólico e aquoso da <i>Annona muricata</i> L.	31
3.2.5	Teste de letalidade da <i>Artemia salina</i>	32

3.2.6	Animais	32
3.2.7	Fase de Adaptação	33
3.2.8	Delineamento experimental	33
3.2.9	Avaliação clínica e avaliação da toxicidade	34
3.2.10	Tratamento	35
3.2.11	Colheita e processamento das amostras	35
3.2.12	Análise estatística	36
3.3	RESULTADOS	36
3.3.1	Avaliação citotóxica	36
3.3.2	Características epidemiológicas	36
3.3.3	Efeitos colaterais	39
3.4	DISCUSSÃO	42
3.5	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO:

Estima-se que mais de 50% dos medicamentos antineoplásicos disponíveis comercialmente derivem de produtos naturais, como plantas, o que exemplifica o potencial farmacêutico destes produtos (KINGHORN et al., 1999). Diante desta perspectiva, diversos produtos provenientes de plantas estão sob avaliação em estudos pré-clínicos e clínicos. Mais de 20 novas drogas foram lançadas no mercado entre os anos 2000 e 2005, originárias principalmente de plantas terrestres. Essas substâncias apresentam diversidade química e demonstram a importância da descoberta de compostos provenientes de fontes naturais, com diferentes mecanismos de ação (CHIN et al., 2006).

O uso de plantas medicinais por pacientes portadores de neoplasias está cada vez mais difundido pelo Brasil e pelo mundo. Em um estudo realizado em João Pessoa (PB) 47,5% dos pacientes com neoplasias malignas afirmaram fazerem uso de plantas medicinais em associação ou não com os medicamentos prescritos por médicos (ARAÚJO et al., 2007).

Dentre as plantas que são utilizadas pela medicina tradicional para casos de neoplasias estão as anonáceas, sendo as mais relatadas: *Annona muricata* Linn, *A. cherimolia*, *A. crassiflora*, *A. nutans*, *A. hipoglauca*, *A. squamosa* e *A. atemoya*. (LÓPEZ-RUBALVACA et al., 2006; PIMENTA et al., 2003; CHIU et al., 2003; GLEYS et al., 2000; AMARO et al., 1998; JARAMILLO et al. 2000; BERMEJO et al., 2005).

Para a validação da atividade antineoplásica das plantas, faz-se necessário realizar sua avaliação *in vivo*, partindo de drogas que apresentaram resultados promissores *in vitro* (KNAPP E WATERS, 1997). Deve-se buscar a utilização de espécies animais como modelo experimental, assim como o estudo da biologia das células neoplásicas e da ação dos quimioterápicos em neoplasias naturalmente adquiridas. Como uma possibilidade para tais condições, pode ser utilizado o modelo do Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTc), naturalmente ou experimentalmente adquirido.

O modelo experimental de cães com TVTc apresenta vantagens por se tratar de uma neoplasia naturalmente adquirida, cujo comportamento biológico está bem compreendido, e envolve as fases de progressão e regressão, relacionadas com o sistema imune do animal. Esse modelo já foi utilizado na pesquisa com a associação do quimioterápico com substâncias homeopáticas (LEFEBVRE et al., 2007) e outras

drogas no objetivo de reduzir a resistência ao tratamento quimioterápico (ANDRADE et al., 2009).

O Ministério da Saúde com o objetivo de estudar, classificar e instituir o programa de Fitoterapia no SUS estipulou que, nos ensaios pré-clínicos e clínicos, o extrato vegetal utilizado no estudo farmacológico e toxicológico deveria ser preparado da mesma forma como a população o utilizava (BRASIL, 2006). Na medicina tradicional, as folhas da *Annona muricata* L. são consumidas como chá, obtido a partir da infusão da folha; pela ingestão de cápsulas contendo folhas desidratadas ou pela ingestão do extrato etanólico (tintura) da folha (TAYLOR, 2004).

Frente ao interesse e a crescente busca por terapias antineoplásicas a partir de fontes naturais como plantas, realizou-se uma revisão bibliográfica sobre o potencial terapêutico da *Annona muricata* L., sendo também abordados os temas teste de letalidade da *Artemia salina* e tumor venéreo transmissível canino (TVTc), por serem estes modelos utilizados para a avaliação da citotoxicidade e da atividade antineoplásica de produtos naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA:

A *Annona muricata* L., ou gravioleira, como é popularmente conhecida, é originária das regiões tropicais da América do Sul e América Central (SÃO JOSÉ, 2003). É uma das importantes frutíferas cultivadas no Brasil, sobretudo nos estados da Bahia, Paraíba, Ceará e Pernambuco. Mede cerca de cinco a seis metros de altura, possui folhas verde-escuras, e produz um grande fruto (SACRAMENTO et al., 2003).

Estudos indicam a utilização de anoneáceas, destacando-se *Annona muricata* L., para o tratamento de diversas afecções pela medicina tradicional (Tabela 1) (PIRES et al., 2009, MOREIRA et al., 2002; BRANCH e SILVA, 1983; SÃO JOSÉ, 2003). Sua utilização é feita pelo consumo do chá obtido a partir da infusão das folhas (TAUFNER et al., 2006; TAYLOR, 2004); pela ingestão de cápsulas contendo folhas desidratadas; ou pela ingestão do extrato etanólico (tintura) da folha (TAYLOR, 2004). Outras partes da planta utilizadas pela medicina popular incluem a infusão da casca e da raiz (BRANCH e SILVA, 1983).

Tabela 1: Indicações de uso da *Annona muricata* L. na medicina tradicional, segundo o tipo de afecção ou indicação terapêutica

Afecção ou indicação terapêutica	Parte da planta utilizada	Forma utilizada	Referência
Picada de cobra	Folha	"sumo"	MOREIRA et al., 2002
Obesidade	Folha	Chá	MOREIRA et al., 2002
Convulsões	Folha	Chá	BRANCH e Silva, 1983
	Casca e raiz		SÃO JOSÉ, 2003
Doenças dos rins	Folha	Chá	BRANCH e SILVA, 1983
Ação sedativa	Casca e raiz	*	SÃO JOSÉ, 2003
Hipertensão	Casca e raiz	*	SÃO JOSÉ, 2003
Verminose	Semente	*	SÃO JOSÉ, 2003
Neoplasias	Casca e raiz	*	SÃO JOSÉ, 2003

* Uso não descrito.

Muitos estudos *in vitro* foram conduzidos para a comprovação da atividade citotóxica de compostos presentes na *Annona muricata* L. (KIM et al., 1998; AMARO et al., 1998; CHANG e WU, 2001; LIAW et al., 2002; CHIU et al., 2003; PIMENTA et al., 2003; ARROYO et al., 2005).

Pimenta e colaboradores (2003) realizaram um estudo que avaliou a atividade citotóxica de extratos alcoólicos de vários tipos de anonáceas pelo Teste de

Letalidade da *Artemia salina*. Nesse estudo, foram utilizadas partes das anonáceas (caule, folhas e sementes), e foi observada boa atividade citotóxica, o que revela o potencial deste gênero em apresentar propriedades pesticidas e antineoplásicas.

A atividade antineoplásica da *A. muricata* é atribuída à presença de substâncias como acetogeninas anonáceas, alcalóides e flavonóides em sua composição química (BERMEJO et al., 2005).

2.1 Acetogeninas anonáceas:

Em uma ampla revisão acerca das acetogeninas (ACGs), Bermejo e colaboradores (2005) relataram que já foram isoladas 417 acetogeninas a partir de folhas, semente, casca e raízes de diferentes anonáceas, dentre elas a *Annona muricata* L.

As várias atividades biológicas atribuídas às ACGs anonáceas incluem atividade citotóxica, imunossupressora e antineoplásica (BERMEJO et al., 2005; GLEYS et al., 2000).

As ACGs são potentes inibidores do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BERMEJO et al., 2005, KIM et al., 1998; CHANG e WU, 2001; LIAW et al., 2002; WU et al., 1995). O complexo I tem um importante papel na manutenção da função bioenergética da célula por dirigir a síntese de ATP dos equivalentes mitocondriais produzidos nas vias oxidativas metabólicas centrais. Como potentes inibidores do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, as ACGs são compostos com potencial para se tornarem uma nova geração de drogas antineoplásicas (CHIU et al., 2003).

Em estudos *in vitro* (Tabela 2) vários extratos de acetogeninas anonáceas obtiveram sua ação citotóxica testada em linhagens celulares tumorais como: hepatoma humano (CHIU et al., 2003; ARROYO et al., 2005; WU et al., 1995; LIAW et al., 2002; CHANG e WU, 2001), carcinoma pancreático (KIM et al., 1998) e adenocarcinoma de cólon (RIESER et al., 1996; KIM et al., 1998); carcinoma pulmonar (RIESER et al., 1996); carcinomas de faringe, ovariano e uterino (AMARO et al., 1998), carcinoma mamário (RIESER et al., 1996; ARROYO et al., 2005) e neoplasia de sistema nervoso central (ARROYO et al., 2005).

Tabela 2: Estudos *in vitro* realizados com anonáceas em busca de compostos ativos contra neoplasias malignas

Espécie da planta	Parte utilizada	Composto utilizado (extrato ou acetogenina anonácea)	Linhagem celular	Referência
<i>Annona atemoya</i>	Semente	Bulatacina	-Hepatoma humano	CHIU et al., 2003
<i>Annona muricata</i>	-Folhas	- extrato	-Carcinomas de faringe, ovariano e uterino	-AMARO et al., 1998 -ARROYO et al., 2005
	-Folhas	- Muricatocina	- Células neoplásicas do SNC, glândula mamária e pulmão	- WU et al., 1995 - LIAW et al., 2002
	-Folhas	- Muricina H, Muricina I, <i>cis</i> -annomontacina	-Neoplasia pulmonar	- CHANG e WU, 2001
	-Sementes	- muricatetrocina A, muricatetrocina B, longifolicina, corossolina, corossolone	- Hepatoma humano	- KIM et al., 1998
		- Annomuricina, muricapentocina	- Hepatoma humano	- RIESER et al., 1996
		- Annonacina, arianacina, javoricina, goniotalamicina, adriamicina	- Carcinoma pancreático e adenocarcinoma de cólon	
<i>Annona purpúrea</i>	*	- extrato	Carcinomas de faringe, ovário e uterino	AMARO et al., 1998
<i>Annona jahnii</i>	*	- extrato	Carcinomas de faringe, ovário e uterino	AMARO et al., 1998
<i>Annona squamosa</i>	*	- extrato	Carcinomas de faringe, ovário e uterino	AMARO et al., 1998
<i>Annona sp.</i>	Semente	- extrato metanólico	Hepatoma humano	BETANCUR-GALVIS et al., 1999

*Parte utilizada não descrita no estudo.

Poucos experimentos *in vivo* foram realizados para testar a ação antineoplásica das anonáceas. Wang e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da acetogenina montanacina (derivada da espécie *Annona Montana*) após implantação de células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), em camundongos. Foi utilizado o extrato etanólico para o isolamento da montanacina, suspensa em NaCl 0,9% e administrada via intraperitoneal, diariamente, sendo evidenciada a redução do volume da neoplasia depois de duas semanas, quando comparado ao grupo controle. Nesse estudo, não foi observada toxicidade nos animais do grupo tratado com a acetogenina.

2.2 Alcalóides:

Além das acetogeninas, a composição química das anoneáceas também inclui a presença de alcalóides como swainsonina, uma substância neurotóxica presente em folhas e casca da *Annona muricata* (0,0004% peso seco) (MOHANTY et al, 2008). A swainsonina foi utilizada juntamente com o 5-fluorouracil em testes *in vitro* em linhagens celulares de neoplasia colon-retal que apresentavam resistência a este quimioterápico. Foi observado que o alcalóide foi efetivo em aumentar a sensibilidade das linhagens celulares ao 5-fluorouracil, por inibição da glicosilação, que está relacionada com a resistência às drogas (HAMAGUCHI et al., 2007).

Klein e colaboradores (1999) realizaram um experimento em que camundongos foram inoculados com células de melanoma e, após crescimento da neoplasia, receberam aplicações de swainsonina por via intraperitoneal, um dia antes da quimioterapia com ciclofosfamida, e por 10 dias consecutivos. Verificou-se que a swainsonina diminuiu a toxicidade da ciclofosfamida, sem interferir em seu potencial antineoplásico. Foi também conduzido um experimento em camundongos para avaliar o efeito da swainsonina em associação ao 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), sendo verificado tanto um aumento da celularidade da medula óssea destes animais, como das células sanguíneas circulantes. Observou-se ainda efeito protetor da swainsonina em linhagens progenitoras mielóides humanas contra a toxicidade do AZT *in vitro*. Estes resultados demonstram que a swainsonina pode ser efetiva para minimizar a toxicidade desencadeada pelo tratamento com quimioterápicos.

O efeito da swainsonina foi avaliado em pacientes humanos com neoplasias em estágio avançado. Os pacientes receberam o alcalóide por via endovenosa, por cinco dias (50 a 550 µg/kg/dia). Nesse estudo dois pacientes apresentaram melhora

clínica de sintomas respiratórios e um paciente apresentou redução de 50 a 70% da massa neoplásica (GOSS et al., 1994).

2.3 Flavonóides:

Outros compostos com atividades biológicas isolados das anonáceas incluem os flavonóides, que possuem potencial para serem utilizados como agentes antineoplásicos. A atividade citotóxica dos flavonóides presentes no extrato metanólico das folhas da *Annona dióica* (Annonacea) foi verificada em culturas de células do carcinoma de Ehrlich, sendo evidenciada ação não seletiva dos flavonóides sobre as DNA-topoisomerasas I e II (VEGA et al., 2007).

2.4 Outras atividades terapêuticas:

Não existem relatos de estudos *in vivo* objetivando a avaliação da atividade antineoplásica da *Annona muricata* L, sejam em neoplasias induzidas ou naturalmente adquiridas. Entretanto, existem estudos que evidenciaram outras atividades biológicas desta planta, utilizando-se de ratos ou camundongos como animais de experimentação. Adewole e Ojewole (2006) avaliaram as respostas de ratos diabéticos ao tratamento que envolvia o consumo oral do extrato aquoso da folha da *Annona muricata* L. na dose 100mg/ kg. Foi observado que os animais tratados com *Annona muricata* L. apresentaram diminuição nas concentrações da glicose sérica, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides.

Além deste estudo, Gupta e colaboradores (2005) conduziram um estudo em ratos e coelhos diabéticos para a avaliação do consumo oral de 350mg/kg do extrato etanólico da *Annona squamosa*. Nesse estudo foi observado efeito hipoglicemiante do extrato nos animais tratados.

2.5 Toxicidade das acetogeninas anonáceas e Alcalóides:

Além das propriedades terapêuticas da *Annona muricata* L., alguns estudos foram realizados acerca da toxicidade advinda do consumo da mesma. Nesse sentido, foi observada incidência elevada de uma forma atípica de parquisionismo nas Ilhas de Guadalupe, sendo esta supostamente relacionada ao consumo da infusão da folha e suco da fruta da *Annona muricata* L. (LANNUZEL et al., 2007).

Lannuzel e colaboradores (2003) relacionaram essa ocorrência com a atividade inibitória do Complexo I da cadeia mitocondrial da acetogenina annonacina que apresenta toxicidade aos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, resultando em necrose celular. Essa ação foi observada em estudos *in vitro* em que foram utilizadas raízes da *Annona muricata* L. para extração da acetogenina annonacina (LANNUZEL et al., 2003; ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007).

Champy e colaboradores (2004) realizaram um estudo *in vivo* para avaliar os efeitos neurológicos do uso da acetogenina annonacina por 28 dias, em ratos, via veia femoral, em doses altas (7,6 mg/Kg/dia) e doses baixas (3,8 mg/Kg/dia). Nesse estudo, a acetogenina annonacina também foi extraída e purificada a partir da raiz da *Annona muricata* L.. As avaliações por microscopia revelaram gliólise, neurodegeneração do gânglio basal, diminuição dos níveis de ATP no cérebro. Não foram observadas mudanças no consumo de água e comida, no peso dos animais ou sinais de comprometimento sistêmico, tanto nos animais tratados com a dose baixa quanto com a dose alta da acetogenina annonacina.

Foram observados sinais de intoxicação (edema, disfunção hepática com aumento da enzima aspartato aminotransferase (AST); aumento sérico da enzima amilase e diminuição sérica do retinol), em pacientes humanos com neoplasias malignas e com hepatopatias, tratados com swainsonina, na dose de 550 µg/Kg/dia (GOSS et al., 1994).

Na avaliação da toxicidade, Gupta e colaboradores (2005) não observaram alterações neurológicas, comportamentais ou sintomas de intoxicação em ratos e coelhos que consumiram até 5000 mg/kg do extrato etanólico da *Annona squamosa*. Entretanto, Stephen Adewole (informação pessoal)¹ relatou que a DL₅₀ do extrato aquoso da folha da *Annona muricata* L. em camundongos variou entre 155 mg/kg (+/- 20), sendo portanto moderadamente seguro nessa espécie.

2.6 Ensaio biológico:

Embora a realização de estudos *in vivo* possibilite a avaliação das atividades terapêuticas/tóxicas das substâncias de forma mais fidedigna, esses estudos demandam maior custo e envolvem questões de bioética que limitam o seu uso.

¹ Informação fornecida pelo autor Stephen Adewole por correspondência eletrônica

Sendo assim, estudos preliminares são sugeridos de forma a minimizar estas questões (HOUGHTON et al., 2007).

Para a avaliação preliminar da citotoxicidade de produtos naturais pode ser utilizado o teste *in vivo* de letalidade em *Artemia salina*, que é de fácil execução e possui baixo custo (MEYER et al., 1982; RICE e MANESS, 2004).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada, comumente usada como alimento para peixes (NASCIMENTO et al., 2008). Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram a relação entre o grau de toxicidade dos extratos de plantas e a dose letal (DL₅₀) de larvas da *Artemia salina*. A partir de então, diversos estudos foram desenvolvidos utilizando este como teste de triagem de compostos bioativos, já que apresenta alta sensibilidade, e possibilita a identificação do potencial citotóxico das plantas e de seus diferentes extratos (PISUTTHANAN et al., 2004; CARVALHO et al., 2009).

Parra e colaboradores (2001) realizaram um estudo comparativo avaliando o resultado de extratos plantas no teste de letalidade da *Artemia salina* e em testes de letalidade em camundongos, sendo observada relação nas DL₅₀ de ambos os testes. Esse resultado veio validar o uso da *Artemia salina* no objetivo de minimizar o número de vertebrados utilizados nos estudos de toxicidade. Rieser e colaboradores (1996) relataram que extratos de plantas que apresentam DL₅₀ com valores inferiores a 250 µg/ml são considerados significativamente ativos.

Apesar das vantagens do teste de letalidade da *Artemia salina*, o mesmo não é específico para avaliação antineoplásica e não possibilita a avaliação o mecanismo de ação dos extratos (MEYER et al., 1982). Sendo assim, os resultados obtidos no teste de letalidade em *Artemia salina* servem como referência inicial para a avaliação dos extratos em testes mais específicos, como em modelos animais com neoplasias induzidas ou naturalmente adquiridas.

2.7 Tumor Venéreo Transmissível Canino (TVTc):

O TVTc é uma neoplasia indiferenciada de células redondas de origem mesenquimatosa, que acomete cães (*Canis familiaris*) e, eventualmente, outros canídeos sociais, tais como o lobo cinza (*Canis lupus*), o coiote (*Canis latrans*), raposas (*Vulpes vulpes*) e chacais (*Canis adustus*) (VONHOLDT e OSTRANDER, 2006). É também conhecido como linfossarcoma e sarcoma de Sticker, condiloma

canino, granuloma venéreo, sarcoma infeccioso, histiocitoma transmissível e hemoblastoma transmissível, sendo essas nomenclaturas baseadas na morfologia celular ou no comportamento biológico (LEFEBVRE et al., 2007; AMARAL et al., 2004). O TVTc foi a primeira neoplasia a ser reproduzida experimentalmente, pelo veterinário russo Novinsky em 1863 (SCHLAFER e MILLER, 2007).

A exata origem do TVTc permanece desconhecida. Acredita-se que o primeiro clone de células tenha se originado a partir de mutações induzidas por vírus, substâncias químicas ou radiações em células caninas normais (DAS e DAS, 2000; SANTOS et al., 2005). É estimado que esse clone tenha surgido há 250 a 2500 anos atrás, sendo, portanto, a mais antiga linhagem celular animal continuamente replicante conhecida (MURGIA et al., 2006). O número de cromossomos das células somáticas é 78 em cães, sendo todos cromossomos acrocêntricos, com exceção de dois. A célula de TVTc apresenta 58 a 59 cromossomos, sendo 13 a 17 deles metacêntricos, e 42 são acrocêntricos (DAS e DAS, 2000).

O sucesso da manutenção dessa linhagem celular até hoje na natureza é atribuído ao modo de transmissão particular desta neoplasia que se dá por transplantação celular alogênica, isto é, transplante de células viáveis entre indivíduos da mesma espécie, fato que normalmente ocorre durante o coito com animais afetados, quando as células tumorais entram em contato com a mucosa ou pele lesada, ou quando estas possuem solução de continuidade. O transplante pode ocorrer também através de lambedura, mordedura e arranhões, de acordo com o hábito do animal (DAS e DAS, 2000; SANTOS et al., 2005, DINGLI e NOWAK, 2006).

O TVTc transplantado, experimentalmente ou espontaneamente, apresenta uma fase de crescimento, uma fase estática e uma fase de regressão. Espontaneamente, acredita-se que a multiplicação das células do TVTc ocorra após duas a três semanas da sua implantação, com mudança de suas características após um período variável de dois a quatro meses (ERÜNAL-MARAL et al., 2004 ; GREATTI et al., 2004), porém pode permanecer por muitos anos com crescimento lento ou inaparente, ou ainda apresentar-se invasivo e metastático (LEFEBVRE et al., 2007). O tempo de estabelecimento e aparência macroscópica da lesão de TVTc foram avaliados em um estudo experimental de implantação da neoplasia em cães saudáveis. Nesse estudo, foi observado que o tempo varia a depender do local de inoculação. Em glândulas mamárias, tecido subcutâneo e musculatura o aparecimento da lesão foi de três a quatro semanas; nos pulmões a lesão pôde ser

visualizada por tomografia computadorizada em cinco semanas após a inoculação; e em cérebro, próstata e fígado, a neoplasia não foi evidenciada antes de sete semanas. As lesões metastáticas também foram avaliadas, não sendo identificadas antes de nove semanas da inoculação das células neoplásicas (RIVIERA et al., 2005).

A origem fenotípica do TVTc é desconhecida, porém, na caracterização imunohistoquímica em busca de marcadores que identificassem essa origem, o TVTc expressou antígenos Vimetina, Lisozima, ACM1, A-1-antitripsina, indicando origem histiocítica (MUKARATIRWA e GRUYS, 2004).

O TVTc é freqüentemente encontrado em regiões de clima tropical e subtropical aonde há grandes populações de cães errantes (VONHOLDT e OSTRANDER, 2006; DAS e DAS, 2000). Sousa e colaboradores (2000) relataram que as fêmeas são mais acometidas que os machos (61,9%) e vonHoldt e Ostrander (2006) acreditam que essa maior incidência em fêmeas se dá pelo comportamento sexual poligâmico característico da espécie canina, isto é, durante o ciclo estral a fêmea copula com diversos machos, aumentando então as chances da neoplasia ser transmitida. Silva e colaboradores (2007) também encontraram maior incidência de TVTc em fêmeas e relacionam essa observação, além do supracitado, ao fato da vulva da fêmea estar intumescida nessa fase, fornecendo maior suprimento sanguíneo na região de implantação da neoplasia. Ao contrário do que relata a maioria dos autores, já foi citada a maior incidência do TVTc em machos do que em fêmeas (KHAN et al., 2009).

Animais sem raça definida são mais predispostos ao acometimento, possivelmente pelo fato dos proprietários terem baixas condições sócio-econômicas, fato relacionado com o livre acesso à rua pelos animais (SILVA et al., 2007). Foi observado que os animais acometidos apresentavam faixa etária de 2 a 7 anos, o que condiz com o período de maturidade e atividade sexual (SOUSA et al., 2000).

2.7.1 Comportamento e Apresentação clínica do TVTc:

Diante do comportamento biológico do TVTc, existe controvérsia quanto sua classificação, uma vez que este pode regredir espontaneamente ou apresentar metástase, a depender da resposta imunológica do animal (NAK et al., 2005) (DAS e DAS, 2000). Nelson e Couto (2001) relatam que a ocorrência de metástase é maior

em animais que possuem a neoplasia há mais de um mês e em animais imunossuprimidos (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Para Mukaratirwa e Gruys (2004) a maioria dos casos de metástase é na realidade implantação ou extensão mecânica da neoplasia para locais como pele, útero e cérvix. Entretanto, existem relatos da localização do TVTc em órgãos como cérebro e olhos (PARK et al., 2006; SOUSA et al., 2000; AMARAL et al., 2004), sendo, nestes casos, a via linfática a principal forma de disseminação das células metastáticas (FERREIRA et al., 2008).

Cohen (1985) relatou que animais com grande massa de TVTc podem apresentar eritrocitose. Nesses animais o nível de eritropoetina estava aumentado e foi possível a extração desse hormônio da neoplasia. Estudos posteriores também relataram a ocorrência de eritrocitose em animais com TVTc (DUARTE et al., 2006).

No macho, o TVTc genital geralmente está localizado na região caudal do pênis (Figura 1), glândula e prepúcio. Na fêmea, a lesão é encontrada na região posterior da vagina e região de junção do vestíbulo e vagina (Figura 2).



Figura 1: Apresentação macroscópica do TVTc, localizado na região caudal do pênis, sendo evidenciado seu aspecto peduncular, superfície rugosa e secreção serosanguinolenta.



Figura 2: Apresentação macroscópica TVTc localizado na região posterior da vagina, apresentado-se friável, multilobular e com secreção serosanguinolenta.

O TVTc na genitália externa de ambos os sexos pode aparecer inicialmente como pápulas hiperêmicas e depois progredir para proliferações com vários aspectos, são eles: (1) tipo couve-flor, (2) peduncular, (3) multilobular e (4) nodular (Figura 3) com produção de secreção que pode ser serosanguinolenta ou fluido hemorrágico, com superfície eventualmente ulcerada (DAS e DAS, 2000; COHEN, 1985).

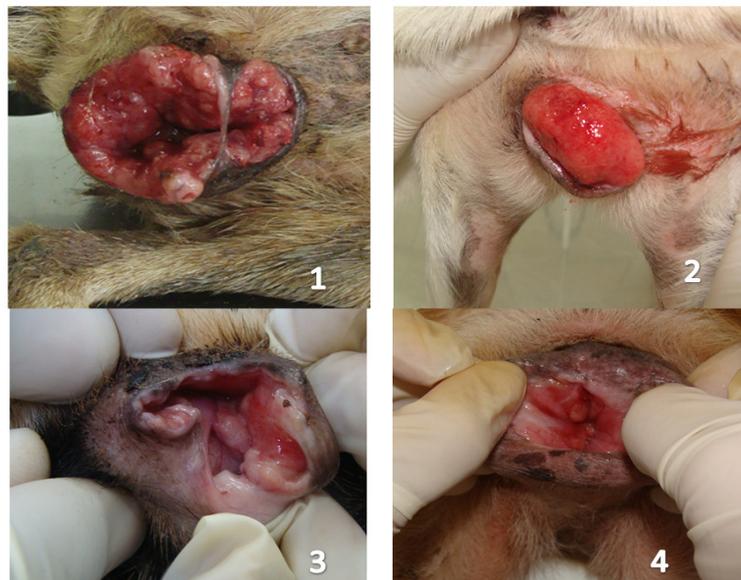


Figura 3: Aspectos do TVTc couve-flor (1), peduncular (2), multilobular (3) e papilar (4).

2.7.2 Resposta imune:

Um aspecto muito interessante do TVTc é o papel da resposta imune do hospedeiro durante a fase progressiva e regressiva da neoplasia (MUKARATIRWA e GRUYS, 2004). Na fase progressiva, o cão mostra sinais de supressão da resposta imune, sendo incapaz de destruir os oncócitos, e permitindo o crescimento do tumor. Demonstrou-se por microscopia eletrônica que após transplante das células do TVTc, existe a ocorrência de um antígeno associado à neoplasia, que adentra na circulação, bloqueando o mecanismo imunológico do hospedeiro. Este antígeno inibiria a expressão de antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de classe I e de classe II na membrana das células neoplásicas. Além disso, há redução de linfócitos B na população de leucócitos circulantes, devido a secreção de uma ou mais proteínas tóxicas, que induzem especificamente a apoptose desses linfócitos. A secreção dessas substâncias pode explicar, em parte, como o TVTc interfere na imunidade humoral na fase de progressão (MUKARATIRWA e GRUYS 2004; SANTOS et al., 2005).

Possivelmente, a reexpressão de antígenos MHC seria responsável pela regressão espontânea do TVTc (PERÉZ et al., 1998). O mecanismo preciso de como as células do TVTc são ativadas para reexpressar antígenos MHC na fase regressiva não foi ainda elucidado (MUKARATIRWA e GRUYS, 2004). Entretanto, sabe-se que durante a fase regressiva há maior concentração de linfócitos B e plasmócitos no infiltrado inflamatório intra e peri-neoplásicos no TVTc, quando comparados com a fase progressiva (PERÉZ et al., 1998). Em consonância com o que ocorre espontaneamente, durante o tratamento quimioterápico, também é evidenciado o aumento da população intra-neoplásica de leucócitos (GONZALEZ et al. 2000).

2.7.3 Diagnóstico:

O diagnóstico do TVTc pode ser realizado a partir do histórico, apresentação macroscópica, achados citológicos e exame histopatológico.

Na avaliação histopatológica, a neoplasia varia de acordo com o estágio de progressão ou regressão. Durante o início de estágio de progressão a neoplasia é composta por células arredondadas, ovais ou poliédricas, com limites indistintos e citoplasma pouco corado ou claro. O núcleo é grande em proporção ao tamanho da célula, com um único e bem definido nucléolo e cromatina grosseira. Há

variabilidade no tamanho das células (anisocitose). Durante a fase regressiva podem ser encontradas células em formato espino-celular e é comumente observado aumento no número de linfócitos infiltrados (SCHLAFER e MILLER, 2007).

Embora a histopatologia seja considerada como um método de diagnóstico definitivo para o TVTc, estudos demonstraram que o exame citológico também pode ser utilizado para firmar o diagnóstico, possuindo a vantagem de ser minimamente invasivo (AMARAL et al., 2004; COWEL et al., 2009).

As características do TVTc que encontram-se em fase progressiva nos exames citológicos são de serem compostos por células redondas, que variam de 12 a 24 μm de diâmetro, com núcleos redondos, excêntricos, com padrão de cromatina granular e uniforme, com um nucléolo único proeminente e baixa relação núcleo:citoplasma. Possuem quantidade moderada de citoplasma azulado, sendo freqüente a presença de vacúolos citoplasmáticos proeminentes. Figuras de mitose são comuns e pode haver a presença de neutrófilos, linfócitos e hemácias (Figura 4) (COWEL et al., 2009).

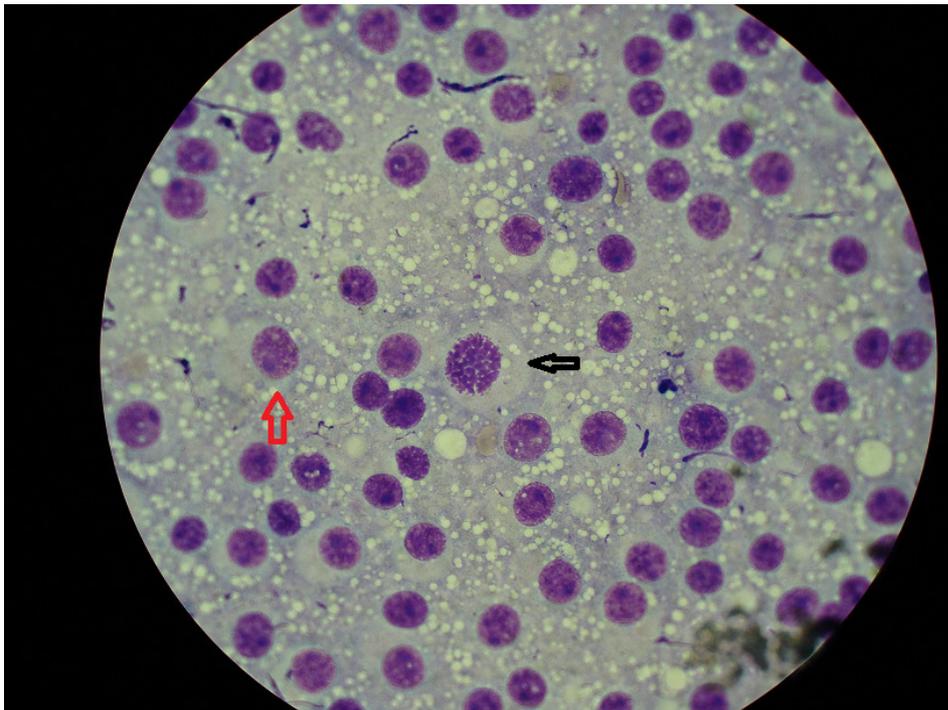


Figura 4: citologia esfoliativa de TVTc com predominância do tipo plasmocitóide, com células de núcleo arredondado, excêntrico, com citoplasma azulado, vacuolizado (seta vermelha). Presença de figuras de mitose (seta preta).

Durante a fase regressiva do TVTc, espontaneamente ou no tratamento quimioterápico, geralmente é observada uma amostra citológica com pouca celularidade com ou sem células neoplásicas fragmentadas. As células de TVTc intactas apresentam citoplasma com intensa vacuolização, com contorno nuclear irregular e o nucléolo pode estar indefinido. Corpos apoptóticos são freqüentes e o infiltrado inflamatório é composto, em grande parte, por linfócitos, sendo também visualizados neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (GONZALEZ et al., 2000).

Há a proposição da classificação morfológica do TVTc em três categorias distintas (plasmocitóide, linfocitóide e misto) de acordo com os padrões celulares observados na citologia. As células neoplásicas do tipo plasmocitóide apresentam baixa relação núcleo:citoplasma e núcleo excêntrico e contorno ovóide. As células neoplásicas de TVTc do tipo linfocitóide, assemelham-se ao linfócitos, e apresentam maior relação núcleo:citoplasma, o contorno celular é arredondado e o núcleo mais centralizado. A citologia possui classificação morfológica mista quando ambos os tipos celulares estão presentes em quantidade inferior a 70% para o tipo plasmocitóide ou o tipo linfocitóide (AMARAL et al., 2004).

2.7.4 Tratamento:

Embora o TVTc possa apresentar regressão espontânea, é recomendado o tratamento para todos os casos devido a possibilidade do mesmo apresentar metástase. O objetivo do tratamento do TVTc é a remissão completa da neoplasia, o que pode ser alcançado com quimioterapia, excisão cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e/ou imunoquimioterapia.

O tratamento preconizado para o TVTc é a quimioterapia com sulfato de vincristina (SOUSA et al., 2000). O sulfato de vincristina é um alcalóide derivado da planta *Vinca rosea* Linn e é um agente específico do ciclo celular. Esse fármaco atua impedindo a metáfase, ligando-se às proteínas dos microtúbulos necessárias à formação dos fusos mitóticos e mitose celular. A inabilidade de segregação correta dos cromossomos durante a mitose leva à morte celular (RODASKI e NARDI, 2008).

Após administração por via endovenosa, o sulfato de vincristina se distribui rapidamente pelo organismo e liga-se aos tecidos, atingindo concentração máxima no plasma em uma hora. A droga é encontrada em níveis mais altos no baço, enquanto que no cérebro e fluido cérebro-espinhal ela permanece a níveis indetectáveis. O metabolismo hepático e a rápida excreção biliar é seguida por

liberação de 70% da droga administrada pelas fezes, enquanto que apenas 15% são excretados na urina (DOBSON et al., 2008).

Para o tratamento do TVTc, o sulfato de vincristina deve ser administrado semanalmente, por via endovenosa, na dose de 0,5 a 0,75 mg/m². Devem-se executar todas as medidas de segurança no manejo do quimioterápico que envolve o uso de luvas, óculos de proteção, máscara e preparo do quimioterápico e doses em capela de exaustão (RODASKI e NARDI, 2008). Foi observada eficácia de 86,6% em cães com TVTc tratados com sulfato de vincristina na dose 0,5 mg/m², com intervalos de 7 a 14 dias entre as aplicações (SAID et al., 2009).

Os efeitos colaterais mais relatados advindos da quimioterapia com sulfato de vincristina em cães envolvem alterações hematológicas, dermatológicas, gastrintestinais e neurológicas (RODASKI e NARDI, 2008).

As alterações hematológicas são pouco freqüentes podendo ocorrer discreta leucopenia e raramente observam-se anemia e trombocitopenia (RODASKI e NARDI, 2008). Já foi relatada a ocorrência de alterações hematológicas como leucopenia, neutropenia, linfocitose, eritropenia, hemoglobulinemia e trombocitopenia (NAK et al., 2005). Said e colaboradores (2009) observaram a ocorrência de 80% de trombocitopenia, 60% de anemia e 33,3% de leucopenia em cães com TVTc tratados com sulfato de vincristina na dose 0,5 mg/m² semanal ou quinzenalmente.

Outros efeitos colaterais relatados ao sulfato de vincristina incluem anorexia, náusea, êmese, estomatite, disfagia, diarreia e alopecia. Também podem ocorrer sinais de neurotoxicidade caracterizados por parestesia, claudicação, déficit proprioceptivo e constipação. Se houver extravasamento perivascular do fármaco, pode ocorrer necrose tecidual (PLUMB, 2002; RODASKI e NARDI, 2008).

Sousa e colaboradores (2000) não observaram efeitos colaterais decorrentes do uso sulfato de vincristina em cães com TVTc, e atribuíram esse fato a precisão adotada nas dosagens em mg/m² quando da administração do agente. Entretanto, Said e colaboradores (2009) relataram que na dosagem de 0,5 mg/m² foram observados os sinais de anorexia (33,3%), diarreia (13%), constipação (6,6%), claudicação (6,6%), alopecia (33%), sendo resolvidos todos os efeitos colaterais após o término do tratamento.

Os pacientes que apresentam TVTc resistente ao tratamento com sulfato de vincristina após a 7^a dose do mesmo, podem ser tratados com doxorubicina na dose

de 30 mg/m², por via endovenosa, a cada 21 dias com no máximo 2 aplicações (SOUSA et al., 2000).

Mukaratirwa e colaboradores (2009) avaliaram o uso da imunoquimioterapia com sulfato de vincristina combinada com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), em administração intraneoplásica, e concluíram ser este protocolo mais eficiente para o tratamento do TVTc que o tratamento com sulfato de vincristina como única droga.

Andrade e colaboradores (2009) compararam o protocolo padrão de tratamento com sulfato de vincristina com outro que envolvia o sulfato de vincristina associada à ivermectina. Os autores observaram menor resistência ao sulfato de vincristina, quando administrada em associação à ivermectina.

Outros agentes quimioterápicos ou combinação de protocolos incorporando a vincristina já foram investigados, como ciclofosfamida, metotrexato e vinblastina (LORIMIER e FAN, 2007; SOUSA et al., 2000), porém nenhum deles ofereceu eficiência/vantagem sobre o tratamento somente com o sulfato de vincristina (LORIMIER e FAN, 2007).

A excisão cirúrgica em casos de TVTc não é recomendada devido à possibilidade de fácil implantação de células de TVTc na manipulação cirúrgica (DAS e DAS, 2000).

A radioterapia é efetiva no tratamento do TVTc com uma a três aplicações, porém é um procedimento que requer imobilização química do paciente e equipamento de alto custo para o processo (DAS e DAS, 2000).

3 EFEITO DA FOLHA DA GRAVIOLEIRA (*Annona muricata* L.) COMO TERAPIA ALTERNATIVA/COMPLEMENTAR AO SULFATO DE VINCRISTINA, EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO (TVTc)

RESUMO

O uso de produtos derivados de plantas desperta interesse, especialmente em relação à descoberta de terapias antineoplásicas, que venha a ser utilizadas como agentes únicos ou de forma complementar aos quimioterápicos. Neste sentido, produtos como a folha da gravioleira (*Annona muricata* L.) estão sob avaliação, sobretudo em decorrência do seu uso na medicina tradicional, em casos de neoplasias em humanos. Nesse estudo foi avaliado o potencial citotóxico dos extratos hidroalcoólico e aquoso da *Annona muricata* L., por meio do teste de Letalidade da *Artemia salina*. O extrato hidroalcoólico mostrou-se citotóxico com a dose letal de 12,54 µg/mL, enquanto que o extrato aquoso não revelou este efeito, apresentando DL₅₀ 317,54 µg/ mL. Como forma de investigar o potencial antineoplásico das folhas da *Annona muricata* L. avaliou-se seu efeito em cães com Tumor Venéreo Transmissível canino (TVTc), naturalmente adquirido. Para tanto, foram utilizados três protocolos de tratamento, a saber, cápsulas com 10 mg/kg, cápsulas com 100 mg/kg e o extrato hidroalcoólico 10 mg/kg, associados ou não à quimioterapia com sulfato de vincristina. O tratamento com *Annona muricata* L., de forma isolada ou em associação, não exerceu efeito sobre o número de aplicações quimioterápicas necessárias para remissão completa do TVTc, quando comparada ao grupo que apenas recebeu sulfato de vincristina. Entretanto, foi observada diferença significativa da frequência de leucocitose nos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Annona muricata* L. em associação à terapia com sulfato de vincristina. Também foi observada hipertermia nos animais que receberam *Annona muricata* L., sugerindo um estímulo ao sistema imune desencadeado por esta planta. A ingestão da *Annona muricata* L. administrada nas doses 10 mg/Kg e 100 mg/Kg, uma vez ao dia, sendo em cápsulas com folhas secas ou extrato hidroalcoólico (10 mg/kg) não levou à intoxicação aguda em cães. Sugere-se a investigação do potencial imunomodulador e antineoplásico da *Annona muricata* L., em outros estudos *in vivo* desenvolvidos com neoplasias naturalmente adquiridas.

Palavras chave: graviola; câncer; fitoterapia; plantas medicinais

EFFECTS OF THE GRAVIOLEIRA'S LEAVES (*Annona muricata* L.) AS A COMPLEMENTARY/ALTERNATIVE THERAPY TO VINCRISTINE SULPHATE, IN CASES OF CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR (TVTc)

ABSTRACT

The use of products derivative from plants brings the attention especially on the discovery of new antineoplastic therapies or those which can be used associated with the chemotherapies. Based on this, the leaves of *Annona muricata* L., and their components, are under investigation because of their traditional uses on cancer human's cases. On this study it was assessed the cytotoxicity of hydro-alcoholic and aqueous extract of *Annona muricata* L., by using the bioassay Letality Test of *Artemia salina*. The hydro-alcoholic extract had more cytotoxicity effect by the lethal dose of 12,45 µg/mL, while the aqueous extract didn't revealed this potential having DL₅₀ 317,54 µg/mL. To evaluate the antineoplastic potential of the leaves of *Annona muricata* L. it was performed the study on dogs with natural occurrence of canine Transmissible Venereal Tumour (TVTc). Therefore there were three treatments with capsules with 10 mg/kg, capsules with 100 mg/kg and the hydro-alcoholic extract (10 mg/kg), combined or not with the chemotherapy with vincristine sulphate. The treatment with *Annona muricata* L., by only itself or in association with the vincristine sulphate was not effective considering the number of chemotherapies sessions necessary to remission of TVTc, when compared to the group that was treated only with the vincristine sulphate. However, it was observed a significant difference on the frequency of leucocytosis on the animals treated with the hydro-alcoholic extract of *Annona muricata* L. (10 mg/kg) in association with the therapy with vincristine sulphate. It was observed hyperthermia on the animals that were treated with *Annona muricata* L., that suggests the stimulation of the immune system's dog by this plant. The ingestion of *Annona muricata* L. on the dosages of 10 mg/kg and 100 mg/kg, once a day, made as capsules with dried leaves or hydro-alcoholic extract (10 mg/kg) didn't lead to an acute intoxication in dogs. More studies *in vivo* with naturally acquired neoplasias are necessary to investigate the immunomodulator and antineoplastic's potential of *Annona muricata* L..

3.1 INTRODUÇÃO:

A *Annona muricata* Linn (graviroleira) vem sendo amplamente estudada devido às suas propriedades terapêuticas, dentre elas o seu uso como agente antineoplásico, atribuído pela medicina tradicional. Nestes casos, sua utilização é feita pelo consumo do chá obtido a partir da infusão de suas folhas (TAUFNER et al, 2006; TAYLOR, 2004); pela ingestão de cápsulas contendo folhas desidratadas; ou pela ingestão do extrato etanólico (tintura) da folha (TAYLOR, 2004).

Baseado em estudos etnobotânicos, foram desenvolvidos estudos *in vitro* que ratificaram o potencial citotóxico de extrato de *Annona muricata* L. sobre linhagens tumorais (AMARO et al., 1998; ARROYO et al., 2005; WU et al., 1995; LIAW et al., 2002; CHANG e WU, 2001; KIM et al., 1998; RIESER et al., 1996). A citotoxicidade foi também verificada utilizando o teste de letalidade da *Artemia salina* (PIMENTA et al., 2003). A atividade citotóxica da *A. muricata* é atribuída à presença de substâncias como acetogeninas (ACGs) anonáceas, alcalóides e flavonóides em sua composição química. As ACGs são potentes inibidores do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BERMEJO et al, 2005). Em estudos *in vitro* vários extratos de acetogeninas anonáceas obtiveram sua ação citotóxica testada em linhagens celulares tumorais. (CHIU et al, 2003; ARROYO et al, 2005; WU et al, 1995; LIAW et al, 2002; CHANG e WU, 2001; KIM et al, 1998; AMARO et al, 1998). Além das acetogeninas, a composição química das anonáceas também inclui a presença de alcalóides como swainsonina (MOHANTY e al, 2008).

Ainda que existam dados na medicina tradicional e experimentos *in vitro* que infiram quanto o efeito citotóxico da *Annona muricata* L., não existem estudos *in vivo* que validem seu efeito antineoplásico. Objetivou-se a partir deste estudo investigar o potencial citotóxico e antineoplásico das folhas de *Annona muricata* L., usando como modelo experimental, respectivamente, o teste de letalidade da *Artemia salina* e cães com TVTc naturalmente adquirido. O modelo de TVTc também possibilitou a avaliação do efeito da associação entre *Annona muricata* L. e o quimioterápico sulfato de vincristina, bem como a toxicidade destas substâncias.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.2.1 AQUISIÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS DA *Annona muricata* L.:

As folhas de *Annona muricata* L. utilizadas neste estudo foram colhidas em um único lote, em abril de 2009, a partir de árvores localizadas no Município de Ilhéus, no Estado da Bahia, Brasil. Foram identificadas por comparação, no Herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz, sob o protocolo 14.044. Após colheita, as folhas foram desidratadas em estufa de secagem, à temperatura entre 50 e 60°C, durante 2 horas. Posteriormente, foram trituradas em moinho com malha de um milímetro (01 mm), e armazenadas em recipiente fechado, protegido da luz solar, até o momento de uso.

3.2.2 CÁPSULAS COM A FOLHA DA *Annona muricata* L. desidratada:

Cápsulas contendo folhas desidratadas e moídas foram manipuladas de forma a conter a dosagem preestabelecida, segundo o peso corporal dos animais.

3.2.3 DOSE de *Annona muricata* L.:

As doses administradas aos animais foram de 10 e de 100 mg/kg da folha desidratada ou do extrato das folhas da *Annona muricata* L.. Essas doses foram estimadas a partir de estudos com anonáceas realizados *in vivo* com camundongos e ratos (ADEWOLE e OJEWOLE, 2006; GUPTA et al, 2005; KALEEM et al, 2006) e foram convertidas para doses em cães, a partir de fórmula de conversão pré-estabelecida para estudos *in vivo* (REAGAN-SHAW et al, 2007).

3.2.4 EXTRATOS HIDROALCOÓLICO E AQUOSO DA *Annona muricata* L.:

Para o preparo dos extratos hidroalcoólico (etanol 70%) e aquoso (água destilada) da folha da *Annona muricata* L. utilizou-se o protocolo descrito por Adewole e Ojewole (2006), com modificações. Adicionou-se 1000 mL de solvente para cada 100 g das folhas desidratadas e moídas da *Annona muricata* L., sendo esta solução mantida durante 48 horas, sob temperatura ambiente e protegida da luz. Após este período, foi realizada a primeira filtração. Ao resíduo, procedeu-se com a adição de mais 1000 mL do solvente, e repetidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente, até a obtenção do segundo filtrado. Ambos os filtrados

foram misturados, extraídos em evaporador rotativo da marca Fisatom 802A, sob a temperatura de 70°C e a 62 RPM (rotações por minuto), e acondicionados em frasco âmbar até o momento do uso.

O peso seco dos extratos hidroalcoólico e aquoso foram realizados em triplicata, sendo estes de 43 mg/mL e 6,58 mg/mL, respectivamente.

3.2.5 TESTE DE LETALIDADE da *Artemia salina*:

O teste de letalidade da *Artemia salina* foi realizado segundo metodologia descrita por Nascimento e colaboradores (2008), a saber:

A quantidade de 2 g de ovos secos de *Artemia salina* foi incubada em 500 mL de água marinha filtrada em filtro de pano, sob iluminação artificial e com aeração, por 48 horas, para que houvesse a eclosão das larvas (metanúplios). Após eclosão, estas foram separadas em sete grupos com 10 indivíduos cada. O primeiro grupo recebeu solução controle (água destilada correspondente a quantidade da maior concentração testada e água salina) e os seis seguintes receberam as soluções dos extratos nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após este período, foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado com seis repetições, para cada concentração.

3.2.6 ANIMAIS:

Foram selecionados para este estudo 25 cães, atendidos no Ambulatório de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UESC, durante o período de agosto de 2008 a dezembro de 2009, que atenderam os seguintes critérios: (1) obtiveram resultado citológico e macroscópico positivo para TVTc, (2) animais hígidos livres de outra patologia fora o TVTc, (3) animais cujos proprietários pudessem executar os retornos semanais e administrar o extrato de *Annona muricata* L. selecionado, ou optaram por deixá-los internados no Hospital Veterinário da UESC, sob supervisão da equipe do projeto.

Foram excluídos do projeto os animais que (1) apresentavam outra condição patológica concorrente com o TVTc, (2) fêmeas gestantes ou que ficaram gestantes durante o tratamento, (3) animais que abandonaram o projeto durante o tratamento,

(² Ovos de Artemia Praveinos MARAMAR ®

c

O estudo com os animais foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – BA, sob número de protocolo 028/09.

3.2.7 FASE DE ADAPTAÇÃO:

Os animais receberam ração comercial balanceada, 15 dias antes do início e durante toda a fase de experimentação. Nessa fase também foi realizado o controle de endo e ectoparasitas nos animais.

3.2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

Após o período de adaptação, os animais foram divididos para a realização de um experimento em quatro grupos de tratamento (Grupo I, Grupo II, Grupo III e Grupo IV) (Figura 5).

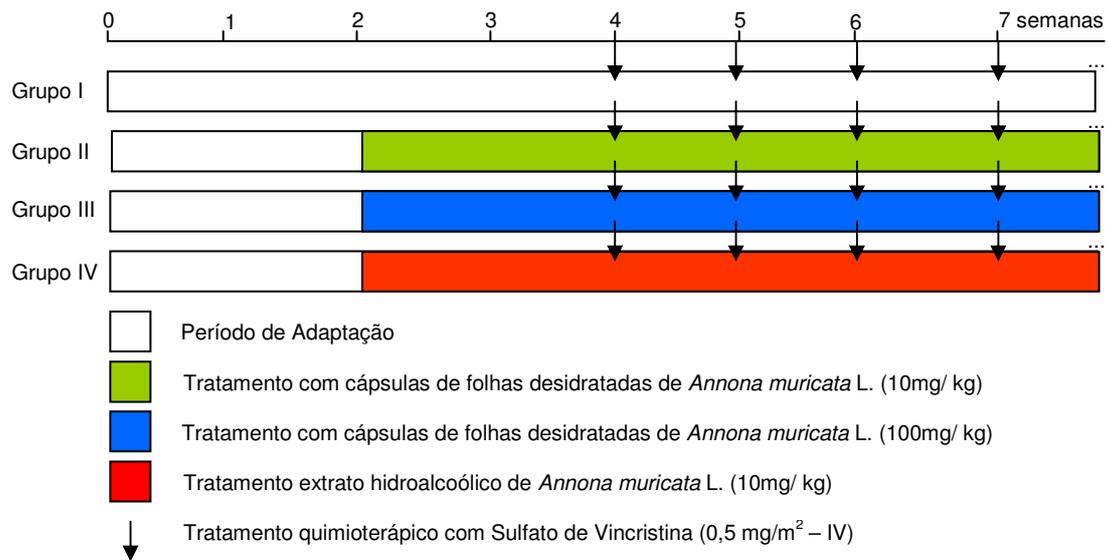


Figura 5: Delineamento experimental com disposição dos tratamentos executados nos grupos I, II, III e IV.

3.2.9 AVALIAÇÃO CLÍNICA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE:

Os animais foram avaliados diariamente em relação ao consumo de água e comida, comportamento, e ocorrência de possíveis efeitos colaterais como anorexia, êmese, diarreia, constipação ataxia, alopecia e claudicação. Semanalmente, foi realizado o exame clínico, em que constavam informações acerca do aspecto geral, higidez, temperatura, peso dos animais; e comportamento e progressão da neoplasia, disseminação sob forma cutânea ou em linfonodos e avaliação do aspecto, consistência, secreção e superfície da mesma.

3.2.10 TRATAMENTO:

GRUPO I:

Os cães do grupo I receberam ração comercial balanceada durante 30 dias e, posteriormente iniciou-se o tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, na dose de 0,5 mg/m², pela via intravenosa (IV). As administrações foram realizadas semanalmente, e para aqueles cães que apresentaram indícios de toxicidade, seja por exame clínico ou hematológico, a administração foi quinzenal.

GRUPO II:

Após o período de adaptação de 15 dias, os animais receberam cápsulas contendo a folha da *Annona muricata* L. desidratada e moída na dose de 10 mg/Kg, uma vez ao dia, por via oral, durante 15 dias. Foi verificado diariamente se a ingestão da *Annona muricata* L. ocorreu de forma adequada.

Após este período foi administrado o quimioterápico sulfato de vincristina, conforme descrito anteriormente, em associação ao tratamento com cápsulas de *Annona muricata* L.

GRUPO III:

Os cães do grupo III receberam o mesmo tratamento que aquele descrito aos animais do grupo II, com a diferença de que as cápsulas continham a dose de 100 mg/Kg de folhas de *Annona muricata* L.

GRUPO IV:

Os cães do grupo IV receberam o mesmo tratamento que aquele descrito aos animais do grupo II e III, com a diferença que foi administrado aos animais o extrato hidroalcoólico da folha da *Annona muricata* L. na dose de 10 mg/Kg, por via oral, uma vez ao dia.

3.2.11 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

EXAME CITOLÓGICO

Semanalmente, foi coletada amostra da superfície da neoplasia sob a forma de citologia esfoliativa. Para os casos em que houve metástases em pele ou linfonodos, a citologia foi realizada por aspiração.

As lâminas foram coradas com coloração panótico rápido e avaliadas em microscópio óptico em relação à ocorrência ou não de células compatíveis com TVTc. Também foi realizada a classificação citológica do TVTc, em plasmocitóide linfocitóide ou misto, segundo critérios definidos por Amaral e colaboradores (2004)

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA:

A coleta de sangue foi realizada em todos os animais, semanalmente, desde o dia da seleção. As amostras contendo 10 mL de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, após tricotomia e assepsia local, e dispostas em frascos com e sem EDTA. Os tubos de ensaio contendo sangue com EDTA foram encaminhados para

realização de hemograma completo com avaliação de: eritrograma, leucograma, proteínas plasmáticas totais e quantificação de plaquetas.

O soro foi utilizado para realização dos exames bioquímicos uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT); fosfatase alcalina (FA) e albumina, utilizando-se Kits comerciais apropriados.

AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA

Para aquelas cadelas que possuíam histórico de cio recente ou possibilidade de gestação, foi realizado o exame ultrassonográfico para avaliar/descartar esta condição antes do tratamento. Também foi realizada a avaliação de metástases em órgãos abdominais.

3.2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A DL_{50} de cada extrato foi obtida pelo método de análise estatística Reed-Muench.

Os dados quantitativos da análise bioquímica sérica e hematológica foram analisados com o delineamento inteiramente ao acaso, por análise de variância (ANOVA), usando-se o teste t com nível de significância de 5%. Nas variáveis qualitativas foram estimadas as freqüências, sendo estas analisadas pelo teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

3.3 RESULTADOS:

3.3.1 Avaliação citotóxica:

As DL_{50} dos extratos aquoso e hidroalcoólico (Tabela 3) foram calculadas a partir dos resultados do teste de letalidade de *Artemia salina*

Tabela 3: Resultados obtidos no teste de letalidade da *Artemia salina* nas diferentes concentrações e DL_{50} dos extratos aquoso e hidroalcoólico da *Annona muricata* L.

	Extrato aquoso	Extrato Hidroalcoólico
1000 µg/ ml	100%	100%
750 µg/ ml	92,98	100%
500 µg/ ml	56,25%	100%
250 µg/ ml	24,56%	99,30%
100 µg/ ml	8,21%	89,24%
50 µg/ ml	0%	45,71%
DL ₅₀ (em 24 horas)	317,54 µg/ ml	12,54 µg/ ml

3.3.2 Características epidemiológicas:

Dos 25 animais deste estudo, cinco foram machos e 20 fêmeas; 19 foram adultos (idade de um a sete anos) e sete idosos (idade acima de sete anos). A maioria dos animais não possuía raça definida (68%); 16% foram Terrier Brasileiro; 8% Pinscher; 4% Pastor Alemão e 4% Poodle.

Além dos 25 animais, um animal foi excluído do projeto por apresentar resistência ao tratamento ao sulfato de vincristina, sendo posteriormente tratado sob protocolo de doxorrubicina (30 mg/m²), obtendo remissão completa do tumor com uma aplicação.

Em relação às práticas de criação e manejo dos animais, verificou-se que 76% destes tinham acesso à rua sem coleira e sem supervisão do proprietário (semi-domiciliados), 12% só tinham acesso conduzidos pelo proprietário e 12% não tinham acesso à rua.

Todos os animais apresentaram TVTc na região genital sendo que três (12%) apresentaram também metástases cutâneas. Um dos animais que apresentou acometimento genital e cutâneo também apresentou lesão ulcerada em palato, positiva em exame citológico para TVTc. O tempo de aparecimento do TVTc variou entre os animais sendo: um a 30 dias (20%), um a três meses (24%), três a cinco meses (20%), acima de cinco meses (8%) e 28% dos animais não possuíam histórico acerca do tempo de aparecimento da lesão.

Avaliação do tratamento com folhas da *Annona muricata* L.

A média do número de sessões de quimioterapia necessárias para a remissão completa da neoplasia variou entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4: Média do número de sessões de quimioterapia necessárias para a remissão completa da do TVTc, segundo os grupos de tratamento

	Média	Desvio Padrão
Grupo I	3,6	0,547
Grupo II	3	0,58
Grupo III	3	0,63
Grupo IV	4,57	1,13

Para a interpretação dos resultados, foram consideradas três fases de tratamento: fase um - fase de adaptação; fase dois - tratamento com folhas de *Annona muricata* L. (Grupos II, III e IV); fase três - que compreende o período de tratamento com o sulfato de vincristina, em associação ou não com a *Annona muricata* L.

Em relação ao aspecto macroscópico da neoplasia genital, na fase um pode-se verificar que 76% dos animais apresentaram TVTc com aspecto tipo “couve-flor”, 16% peduncular, 4% multilobular e 4 % papilar. As neoplasias apresentaram consistência firme (84%) ou friável (16%); secreção sero-sanguinolenta (64%), sanguinolenta (28%) ou purulenta (8%); e superfície rugosa (56%), ulcerada (36%) ou lisa (8%).

Foi observada regressão macroscópica parcial da neoplasia nos diferentes grupos experimentais, mesmo antes da instituição da quimioterapia (fase três), como pode ser observado na Tabela 5. Embora nas fases um e dois tenha sido observada maior frequência de regressão nos animais dos grupos II e III, não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 5: Percentagem de regressão macroscópica parcial do TVTc, na fase de adaptação (fase um), durante o tratamento com *Annona muricata* L. (fase dois) e durante o tratamento quimioterápico, em associação ou não à *Annona muricata* L. (fase três), segundo os diferentes grupos experimentais

Grupo	Período		
	Fase um	Fase dois	Fase três
I	20% ^{n.s.}	20% ^{n.s.}	100%
II	42,75% ^{n.s.}	71,42% ^{n.s.}	100%
III	50% ^{n.s.}	66,6% ^{n.s.}	100%
IV	14,28% ^{n.s.}	42,85% ^{n.s.}	100%

N.S. Não significativo

Durante a fase três, os animais permaneceram em tratamento até que fosse evidenciada remissão completa macroscópica da neoplasia e ausência de células de TVTc no exame citológico.

Foram realizados 282 exames citológicos durante as três fases de tratamento. Observou-se predomínio das células neoplásicas do tipo plasmocitóide (86,87%), avaliando-se todo o período experimental. Foram constatadas variações nos tipos citológicos de TVTc, em todos os grupos experimentais, durante as fases um, dois e três (Tabela 6). Ressalta-se que, quando considerado um mesmo animal, foi verificada variação entre os tipos de células neoplásicas predominantes, isto é, plasmocitóide ou linfocitóide, no decorrer das semanas de tratamento em 68% destes.

Tabela 6: Frequência dos tipos citológicos plasmocitóide e linfocitóide nos grupos de tratamento, nas fases um, dois e três

	Fase Um		Fase Dois		Fase Três	
	Plasmocitóide	Linfocitóide	Plasmocitóide	Linfocitóide	Plasmocitóide	Linfocitóide
Grupo I	100%	0%	93,33%	6,66%	80%	20%
Grupo II	90,47%	9,53%	60%	40%	100%	0%
Grupo III	95,12%	4,87%	78,57%	21,42%	50%	50%
Grupo IV	76,74%	23,25%	80%	20%	89,47%	10,52%

3.3.3 Efeitos colaterais:

Para avaliação dos efeitos colaterais, foram analisados os sinais clínicos, bioquímicos e hematológicos dos animais. Em relação aos sinais clínicos, foi avaliada a ocorrência de hipertermia, anorexia, constipação, vômito, diarreia e ataxia. As Tabelas 7 e 8 são representativas da frequência destes sinais nas fases dois e três dos tratamentos, respectivamente. Em ambas as fases, o grupo III foi o que apresentou maior frequência de efeitos colaterais. Entretanto, esta diferença não foi significativa.

Tabela 7: Frequência de efeitos colaterais observados nos cães animais na fase dois

GRUPO	ANOREXIA	VÔMITO	CONSTIPAÇÃO	ATAXIA	DIARRÉIA	HIPERTERMIA
I	20% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}
II	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	14,28% ^{n.s.}
III	16,66% ^{n.s.}	16,66% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	16,66% ^{n.s.}	16,66% ^{n.s.}
IV	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	14,28% ^{n.s.}

N.S. Não significativo

Tabela 8: Ocorrência de efeitos colaterais na fase três

GRUPO	ANOREXIA	VÔMITO	CONSTIPAÇÃO	ATAXIA	DIARRÉIA	HIPERTERMIA
I	40% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	20% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}
II	28,57% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}
III	16,66% ^{n.s.}	50% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	33,33% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}
IV	28,57% ^{n.s.}	28,57% ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	0 ^{n.s.}	14,28% ^{n.s.}

N.S. Não significativo

Em relação aos exames bioquímicos, durante a fase dois, o grupo IV apresentou aumento significativo da enzima AST quando comparado aos outros

grupos ($p < 0.05$), mas esta permaneceu dentro dos valores de referência para a espécie (Tabela 9). Para as demais enzimas, não foi observada diferença entre os grupos.

Tabela 9: Análise das médias dos grupos nas dosagens bioquímicas na fase 2

	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Creatinina	1,23 ^{n.s.}	± 0,20	1,01 ^{n.s.}	± 0,54	0,94 ^{n.s.}	± 0,41	0,29 ^{n.s.}	± 0,02
Uréia	42,87 ^{n.s.}	± 13,02	52,07 ^{n.s.}	± 31,93	37,6 ^{n.s.}	± 10,76	29,92 ^{n.s.}	± 6,18
ALT	24,9 ^{n.s.}	± 12,68	17,85 ^{n.s.}	± 6,46	16,2 ^{n.s.}	± 4,76	20,78 ^{n.s.}	± 12,64
AST	16 ^a	± 6,03	17,42 ^a	± 7,19	18,3 ^a	± 7,18	34,71 ^b	± 17,32
Albumina	2,66 ^{n.s.}	± 0,33	2,09 ^{n.s.}	± 0,62	2,49 ^{n.s.}	± 0,52	2,10 ^{n.s.}	± 0,63
GGT	4,55 ^{n.s.}	± 1,72	3,10 ^{n.s.}	± 1,28	4,44 ^{n.s.}	± 0,78	6,20 ^{n.s.}	± 3,92
FA	122 ^{n.s.}	± 54,95	127,85 ^{n.s.}	± 97,26	51,8 ^{n.s.}	± 32,87	152,42 ^{n.s.}	± 82,45

Médias acompanhadas por N.S. não diferiram entre si; Médias acompanhadas por letras distintas diferiram significativamente entre si, pelo Teste t (5% de nível de significância); D.P. (desvio padrão)

Na fase três, foi observada diferença significativa nas dosagens de creatinina, entre o grupo IV e os demais grupos (Tabela 10). Entretanto os valores permaneceram dentro dos valores de referência para esta espécie. Não foi observada diferença significativa para as demais variáveis

Tabela 10: Análises das médias dos grupos nas dosagens bioquímicas na fase 3

	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Creatinina	1,23 ^a	± 0,20	1,00 ^a	± 0,54	0,87 ^a	± 0,41	0,40 ^b	± 0,02
Uréia	36,76 ^{n.s.}	± 8,13	45,21 ^{n.s.}	± 28,86	31,04 ^{n.s.}	± 4,66	30,74 ^{n.s.}	± 5,11
ALT	49,63 ^{n.s.}	± 47,21	23,36 ^{n.s.}	± 5,06	21,41 ^{n.s.}	± 5,09	21,80 ^{n.s.}	± 13,33
AST	27,23 ^{n.s.}	± 16,93	21,60 ^{n.s.}	± 8,54	21,29 ^{n.s.}	± 6,86	25,57 ^{n.s.}	± 2,04
Albumina	2,52 ^{n.s.}	± 0,48	2,21 ^{n.s.}	± 2,27	2,44 ^{n.s.}	± 0,53	2,50 ^{n.s.}	± 2,46
GGT	5,47 ^{n.s.}	± 1,41	5,24 ^{n.s.}	± 4,99	4,76 ^{n.s.}	± 4,99	5,79 ^{n.s.}	± 4,37
FA	164,06 ^{n.s.}	± 198,68	135,56 ^{n.s.}	± 81,39	70,75 ^{n.s.}	± 41,36	182 ^{n.s.}	± 134,30

Médias acompanhadas por N.S. não diferiram entre si; Médias acompanhadas por letras distintas diferiram significativamente entre si, pelo Teste t (5% de nível de significância); D.P. (desvio padrão)

Em relação aos valores hematológicos, não houve diferença significativa entre as médias das hemácias, hematócritos, leucócitos e plaquetas, durante as fases dois (Tabela 11) e três (Tabela 12), entre os grupos de tratamentos.

Tabela 11: Médias dos valores das hemácias, hematócritos, leucócitos e plaquetas, dos grupos de tratamentos, na fase dois

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
--	---------	----------	-----------	----------

	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Hemácias	5871,4 ^{n.s.}	± 1189,1	5680,07 ^{n.s.}	± 642,40	5694,72 ^{n.s.}	± 670	5306,28 ^{n.s.}	± 425,6
hematócritos	40 ^{n.s.}	± 5,85	35,30 ^{n.s.}	± 5,43	39,41 ^{n.s.}	± 5,35	37,80 ^{n.s.}	± 4,51
Leucócitos	15067,2 ^{n.s.}	± 5303,1	13036,8 ^{n.s.}	± 4503,5	15560,1 ^{n.s.}	± 1941,63	18052 ^{n.s.}	± 3669
Plaquetas	219680 ^{n.s.}	± 65178	194061 ^{n.s.}	± 64831	249694 ^{n.s.}	± 77562,5	234273 ^{n.s.}	± 58943

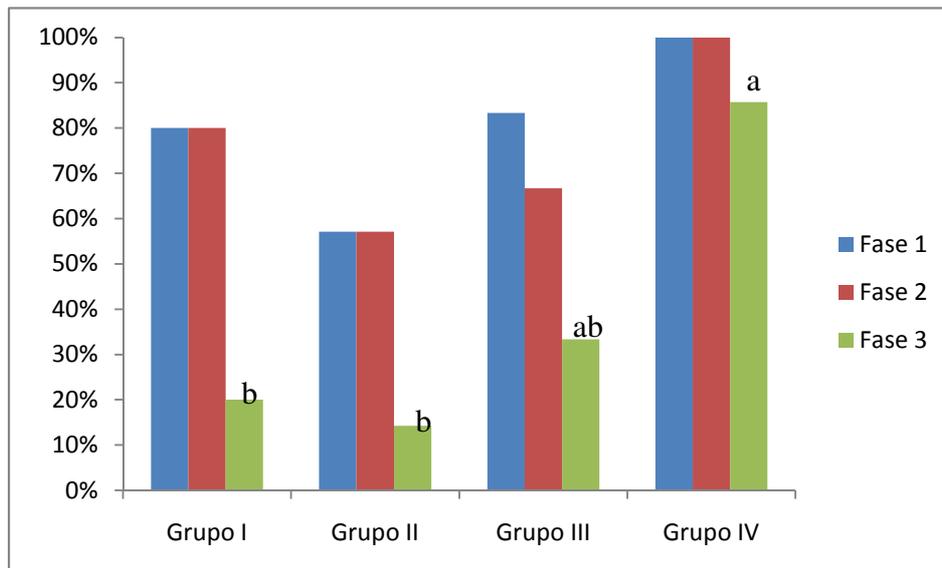
Médias acompanhadas por N.S. não diferiram entre si; Médias acompanhadas por letras distintas diferiram significativamente entre si, pelo Teste t (5% de nível de significância); D.P. (desvio padrão)

Tabela 12: Médias dos valores das hemácias, hematócritos, leucócitos e plaquetas, dos grupos de tratamentos, na fase três

	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Hemácias	5227,92 ^{n.s.}	±786,32	4919,93 ^{n.s.}	±536	5228,13 ^{n.s.}	±663,13	5037,58 ^{n.s.}	±954,1
Hematócrito	37,57 ^{n.s.}	±3,47	34,63 ^{n.s.}	±1,02	38,80 ^{n.s.}	±6,83	34,89 ^{n.s.}	±5,27
Leucócitos	8997,27 ^{n.s.}	±3713,8	9452,7 ^{n.s.}	±5276	10000,2 ^{n.s.}	±4715,45	11637,3 ^{n.s.}	±3581
Plaquetas	214800 ^{n.s.}	±39144	209512 ^{n.s.}	±41544	211283 ^{n.s.}	±74626,3	278967 ^{n.s.}	±76746

Médias acompanhadas por N.S. não diferiram entre si; Médias acompanhadas por letras distintas diferiram significativamente entre si, pelo Teste t (5% de nível de significância); D.P. (desvio padrão)

Embora não tenha havido diferenças significativas nos parâmetros hematológicos entre os grupos experimentais, foi observada ocorrência de leucocitose, em todas as fases (Figura 6). Considerou-se como leucocitose índices de leucócitos acima de 17.000/ mm³, sendo esta variável mensurada semanalmente. Houve associação não casual entre a freqüência de leucocitose e o tratamento do grupo IV, na fase três, quando comparado com os grupos I (4,42%) e II (1,42%).



Freqüências acompanhadas por letras distintas diferiram significativamente entre si, pelo Teste Exato de Fisher (5% de nível de significância)

Figura 6: Ocorrência de leucocitose nos grupos I, II, III e IV, segundo as fases do tratamento.

A freqüência de leucopenia (leucócitos $< 7.000/\text{mm}^3$) (Figura 7), apesar de variar nos grupos experimentais, não foi significativa pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$), a depender da fase de tratamento.

Nenhum animal apresentou injúria de tecido perivascular por extravasamento do quimioterápico.

3.4 DISCUSSÃO:

O potencial citotóxico das anonáceas já foi amplamente estudado tanto em testes biológicos com linhagens celulares (WU et al., 1995; RIESER et al., 1996; AMARO et al., 1998; KIM et al., 1998; CHANG e WU, 2001; LIAW et al., 2002; CHIU et al., 2003; ARROYO et al., 2005) quanto com o ensaio da *Artemia salina* (RIESER et al. 1996; PIMENTA et al.; 2003). No presente estudo, o efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de *A. muricata* foi verificado pelo teste de letalidade da *Artemia salina* que apresentou DL_{50} de $12,54 \mu\text{g}/\text{mL}$. Este efeito não foi observado em relação ao extrato aquoso, que apresentou DL_{50} $317,54 \mu\text{g}/\text{mL}$. Extratos não purificados que apresentam DL_{50} inferior a $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ são considerados significativamente ativos (RIESER et al., 1996), e são bons candidatos para o desenvolvimento de terapias antineoplásicas (PIMENTA et al., 2003).

A partir da citotoxicidade observada pelo extrato hidroalcoólico de *A. muricata*, optou-se por verificar o potencial antineoplásico desse extrato no modelo *in vivo* utilizando-se cães com TVTc naturalmente adquirido. Também foram avaliados os efeitos da ingestão de cápsulas contendo folhas desidratadas de *A. muricata* neste modelo, por ser esta uma das formas utilizadas para o tratamento de neoplasias na medicina tradicional (TAYLOR, 2004).

O tratamento com *A. muricata*, de forma isolada ou em associação ao sulfato de vincristina, não exerceu efeito sobre o número de aplicações quimioterápicas necessárias para remissão do TVTc, quando comparada ao grupo que apenas recebeu sulfato de vincristina. Também não foi observada diferença significativa do tratamento com *A. muricata* sobre a regressão parcial do TVTc. Entretanto, pôde-se verificar que nos grupos que foram tratados com *A. muricata* observou-se maior freqüência de regressão parcial, o que pode revelar o potencial antineoplásico desta planta.

Ainda que diferentes preparos de *A. muricata* sejam utilizados pela medicina tradicional para o tratamento de neoplasias, não existem experimentos *in vivo* que

validem esta indicação. Experimentos *in vitro* apontam para o potencial citotóxico de compostos presentes na *Annona muricata* L. sobre linhagens tumorais (KIM et al., 1998; AMARO et al., 1998; CHANG e WU, 2001; LIAW et al., 2002; CHIU et al., 2003; PIMENTA et al., 2003; ARROYO et al., 2005). Esta atividade é atribuída à presença de substâncias como acetogeninas anonáceas, alcalóides e flavonóides em sua composição química (BERMEJO et al., 2005)

Gás e colaboradores (1994) avaliaram o efeito do alcalóide swainsonina em pacientes humanos com neoplasias em estágio avançado. Os pacientes receberam o alcalóide por via endovenosa, por cinco dias (50 a 550 µg/kg/dia), sendo verificada melhora clínica dos sintomas respiratórios em dois pacientes e um paciente apresentou redução de 50 a 70% da massa neoplásica. Wang e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da acetogenina montanacina (derivada da espécie *Annona Montana*) sobre células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), implantadas em camundongos, sendo evidenciada a redução do volume da neoplasia após duas semanas.

Além dos efeitos citotóxicos e antineoplásicos, as anoneáceas e seus constituintes químicos, também foram reportados por desempenharem efeito imunomodulador e de diminuição dos efeitos tóxicos sobre o sistema hematopoiético associados à quimioterapia (KLEIN et al., 1999)

O quimioterápico utilizado neste estudo, sulfato de vincristina, é um alcalóide derivado da planta *Vinca rosea* Linn, que pode produzir como efeitos colaterais alterações hematológicas, como leucopenia, neutropenia, linfocitose, eritropenia, hemoglobulinemia e trombocitopenia (NAK et al., 2005; SAID et al. 2009). Neste estudo, o tratamento com sulfato de vincristina, associado ou não à *Annona muricata* L. não repercutiu em alterações nas médias dos parâmetros hematológicos avaliados. Entretanto, foi observada diferença significativa da freqüência de leucocitose nos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Annona muricata* L. (10 mg/kg) em associação à terapia com sulfato de vincristina, quando comparada ao grupo que recebeu somente o quimioterápico. Também foi observado que os grupos tratados com *Annona muricata* L. apresentaram menor freqüência de leucopenia durante o tratamento quimioterápico, embora estes dados não tenham diferido significativamente. Klein e colaboradores (1999) observaram aumento do número de leucócitos circulantes em camundongos tratados com swainsonina após tratamento com a droga mielosupressora 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT). Também

verificaram que o uso da swainsonina conferiu proteção à medula óssea de camundongos *in vivo* tratados com o quimioterápico ciclofosfamida.

Em relação aos demais efeitos colaterais associados ao sulfato de vincristina, constatou-se a ocorrência de anorexia em todos os grupos experimentais, com maior frequência observada no grupo tratado apenas com o quimioterápico. Também foi constatada a ocorrência de constipação, no grupo tratado apenas com sulfato de vincristina, e de vômito, diarreia e hipertermia, nos grupos tratados com sulfato de vincristina em associação à *Annona muricata* L.. Estudos relataram a ocorrência de diferentes efeitos colaterais advindos do tratamento com sulfato de vincristina em cães com TVTc, sendo estes, anorexia (14%) e diarreia (8%) (NAK et al, 2005); anorexia (33,3%), diarreia (13%) e constipação (6,6%) (SAID et al, 2009). Khan e colaboradores (2009) observaram vômito em animais tratados com sulfato de vincristina, após dois a três dias da administração deste quimioterápico. Entretanto, Sousa e colaboradores (2000) não observaram ocorrência de efeitos colaterais.

A hipertermia observada nos grupos dos animais tratados com *Annona muricata* L., provavelmente decorre do estímulo ao sistema imune, uma vez que este achado também foi constatado no período em que os animais estavam apenas sobre o tratamento com esta planta. Este achado, em associação a leucocitose, pode indicar um efeito imunoestimulante, devendo ser avaliado.

Outra alteração associada ao tratamento com *Annona muricata* L. foi a elevação da enzima AST sérica, observada no grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico (10mg/kg). Embora estes valores não tenham ultrapassado dos valores referencias para a espécie, recomenda-se monitoramento deste parâmetro, uma vez que Goss e colaboradores (1994) também relataram aumento sérico da enzima AST em pacientes humanos com neoplasias malignas, tratados com swainsonina, um alcalóide presente na folha da *Annona muricata* L.

Alguns autores indicam que o consumo de *Annona muricata* L. pode induzir a alterações no sistema neurológico. Lannuzel e colaboradores (2007) observaram incidência elevada de uma forma atípica de parquisionismo nas Ilhas de Guadalupe, sendo esta supostamente relacionada ao consumo da infusão da folha e suco da fruta da *Annona muricata* L. Champy e colaboradores (2004) realizaram um estudo *in vivo* para avaliar os efeitos neurológicos do uso da acetogenina annonacina por 28 dias, em ratos, via veia femoral, em doses altas (7,6 mg/Kg/dia) e doses baixas

(3,8 mg/Kg/dia). Nesse estudo, a acetogenina annonacina foi extraída e purificada da raiz da *Annona muricata* L.. As avaliações por microscopia revelaram gliólise, neurodegeneração do gânglio basal, diminuição dos níveis de ATP no cérebro. Não foram observadas alterações no consumo de água e comida, no peso dos animais ou sinais de comprometimento sistêmico, tanto nos animais tratados com a dose baixa quanto com a dose alta da acetogenina annonacina. No presente estudo, nenhuma alteração neurológica foi observada nos animais submetidos ao tratamento com *Annona muricata* L..

A avaliação dos efeitos do tratamento com *Annona muricata* L. em cães portadores de TVTc naturalmente adquiridos é de grande relevância por ser esta uma neoplasia responsiva à quimioterapia e cujo comportamento biológico associa-se com a imunidade do animal. Desta forma, estes parâmetros devem ser avaliados de forma integrada, em similaridade com os casos de neoplasias em humanos.

A partir deste modelo, também foram obtidas informações relevantes sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos do TVTc. Neste sentido, ressalta-se sua maior incidência em fêmeas (80%) Sousa e colaboradores (2000) encontraram incidência de 61,9% em fêmeas e acredita-se que essa observação seja devido ao comportamento de poligamia da espécie canina uma vez que é observado que durante o ciclo estral a fêmea aceita o maior número de machos possível (VONHOLDT e OSTRANDER, 2006) além do fato da vulva da fêmea estar mais vascularizada nesse período, o que favorece o estabelecimento da célula neoplásica (SILVA et al.; 2007). Já foi relatada maior incidência do TVTc em machos (KHAN et al., 2009).

A incidência do TVTc foi maior em animais adultos (76%) que em animais idosos, o que condiz com o período de maturidade sexual, segundo Sousa e colaboradores (2000) que também observaram essa maior incidência. Dos animais atendidos 68% não possuíam raça definida. O mesmo foi observado por Silva e colaboradores (2007) que relaciona o achado com a baixa renda dos proprietários. Isso também revela o fator de risco mais importante que é o acesso à rua pelos animais sem coleira e sem supervisão dos proprietários, que, nesse estudo, foi observado em 75% dos animais.

Todos os animais apresentaram localização genital do TVTc e 12% deles também apresentaram lesões cutâneas. Possivelmente, às condições de manejo precário repercutiram no tempo de progressão da neoplasia e na ocorrência de

metástases, influenciada pela baixa imunidade dos animais. Tais condições justificam a regressão parcial do TVTc observada durante a fase de adaptação, em que foi fornecida aos animais ração comercial balanceada e efetuados os controles de endo e ectoparasitas. .

Em relação ao exame citológico, foi observada maior prevalência do tipo celular plasmocitóide (86,87%) em relação ao linfocitóide. Entretanto, observou-se que 68% dos animais apresentaram variação no tipo celular no decorrer do período experimental, não sendo possível estabelecer nenhuma associação entre o tipo celular e o comportamento biológico da neoplasia.

A resistência ao tratamento com sulfato de vincristina foi observada em 3,84% dos animais, o que mostra uma eficácia quimioterápica de 96,16%. Said e colaboradores (2009) observaram uma eficácia do tratamento com sulfato de vincristina de 86,6%.

O TVTc é um bom modelo experimental para a avaliação de terapias antineoplásicas, incluindo aquelas derivadas de produtos naturais. Entretanto, considerando-se que os animais que compuseram este estudo foram provenientes da casuística, esta população apresentou muitas variáveis, que podem interferir na resposta ao tratamento, sendo recomendado a execução de outros estudos com uma população maior, e que se apresente de forma mais homogênea.

3.5 CONCLUSÕES:

O teste de Letalidade da *Artemia salina* revelou que o extrato hidroalcoólico da *Annona muricata* L. demonstrou excelente efeito citotóxico, enquanto que o extrato aquoso revelou baixo potencial para esta atividade.

Os diferentes tratamentos com *Annona muricata* não influenciaram no número de administrações do quimioterápico sulfato de vincristina necessários para promoverem regressão total do TVTc nos cães . Entretanto, foram verificadas características de estímulo do sistema imune, sobretudo nos animais tratados com extrato hidroalcoólico (10 mg/kg).

Sugere-se a investigação do potencial imunomodulador e antineoplásico da *Annona muricata* L., em outros estudos *in vivo* desenvolvidos com neoplasias naturalmente adquiridas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEWOLE, S.O.; OJEWOLE, J.A.O. Immunohistochemical and biochemical effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **Pharmacologyonline**, v.2, p. 335-355, 2006.
- AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; SILVA, S.B.; ROCHA, N.S. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n. 551, p. 167-171, 2004.
- AMARO, M. I.; ORFILA, L.; COLMAN, T. Cytotoxic effects in vitro of the extracts of plants from annonaceous in tumoral and normal cell. **Toxicology Letters**, v. 95, Supplement 1, p. 153-153, 1998.
- ANDRADE, S. F.; SANCHES, O.C.; GERVAZONI, E. R.; LAPA, F. A. S; KANEKO, V. M. Comparação entre dois protocolos de tratamento do tumor venéreo transmissível em cães. **Clínica veterinária**, n. 82, p. 56-62, 2009.
- ARAÚJO, E.C.; OLIVEIRA, R.A.G.; CORIOLANO, A.T.; ARAÚJO, E.C. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v.8, n.2, p.44-52, 2007.
- ARROYO, J. A.; PRASHAD, M.G.; VÁSQUEZ, Y.B.; LI, E.P.; TOMÁS, G.C. Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervoso central. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 22, n. 4, p. 247-253, 2005.
- BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 269-303, 2005.
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A. OSSA, J.E. Antitumor and antiviral activity of Colombial Medicinal Plant Extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 531-535, 1999.

BRANCH, L.C.; SILVA, M.F. Folk medicine of Alter do Chão, Para, Brazil. **Acta Amazonica**. V. 5, n.5-6, p.737-797, 1983.

BRASIL. **Fitoterapia no SUS e Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p.

CARVALHO, C.A.; MATTA, S.L.P.; MELO, F.C.S.A; ANDRADE, D.C.F.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; SILVA, M.B.; ROSA, M.B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo citoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. V. VI, n. 1, p.51 – 57, 2009.

CHIU, H.F.; CHIH, T.T.; HSIAN, Y.M.; T, C.H.; WU, M.J.; WU, Y.C. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 319-327, 2003.

COHEN, D. The Canine Transmissible Venereal Tumor: A unique result of tumor progression. GREENSTEIN, J.P.; HADDOW, A. In: **Advances in Cancer Research**. V. 43, Editora Academic Press1985. p. 75-112

COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DeNICOLA, D.B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3ª Ed. São Paulo: Ed. MedVet, 2009, 476p.

CHANG, F.R.; WU, Y.C. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal Natural Products**. v. 64, p. 925-931, 2001.

CHAMPY, P. HÖGLINGER, G.U.; FÉGER, J.; GLEYE, C.; REYNALD, H.; LAURENS, A.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; MICHEL, P.P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of

mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 63-69, 2004.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**. N. 8, v. 2, p. 239-253, 2006.

DOBSON, J.M.; HOHENHAUS, A.E.; PEASTON, A.E. Cancer Chemotherapy. MADDISON, J. In: **Small Animal Clinical Pharmacology**. 2ª Edição. Canada: W.B. Saunders, p.330-364, 2008.

DUARTE, R.; NIERO, R.; DORETTO, J.S.; MANZAN, R.M.; KOGIKA, M.M. Eritrocitose associada ao tumor venéreo transmissível em cão: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 58, n.6, 1018 – 1023, 2006.

DAS, U. e DAS, A. K. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. **Veterinary Research Communications**. v. 24, p. 545–556, 2000.

DINGLI, D.; NOWAK, M.A. Infectious tumour cells. **Nature**. V. 443, n. 7, p 35-36, 2006.

ESCOBAR-KHONDIKER, M.; HÖLLERHAGE, M.; MURIEL, M.P.; CHAMPY, P.; BACH, A.; DEPIENNE, C.; RESPONDEK, G.; YAMADA, E.S.; LANNUZEL, A.; YAGI, T.; HIRSCH, E.C.; OERTEL, W.H.; JACOB, R.; MICHEL, P.; RUBERG, M.; HÖGLINGER, G.U. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n.29, p. 7827-7337, 2007.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Doenças do cão e do gato. In: **Tratado de Medicina interna veterinária**. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. V. 1, p. 578-579.

ERÜNAL - MARAL et al., 2000 apud GREATTI et al.. Proliferation indexes determination by CEC and Ki-67 in fine needle aspiration cytology of transmissible venereal tumor. **Archives of Veterinary Science**. v.9, n.1, p. 53-59, 2004.

FERREIRA, A.J.A; JAGGY, A.; VAREJAO, A.P.; FERREIRA, M.L.P.; CORREIA, J.M.J.; MULLAS, J.M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **Journal of Small Animal Practice**. V. 41, n. 1, p. 165-168, 2008.

GLEYE, C.; TAYNAUD, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Cohibins C and D, Two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1192-1196, 2000.

GONZALEZ, C.M.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B.R. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**. V. 122, p. 241-248, 2000.

GOSS, P.E.; BAPTISTE, J.; FERNANDES, B.; BAKER, M.; DENNIS, J.W. A phase I study of swainsonine in patients with advanced malignancies. **Cancer Research**, n. 54, p. 1450 – 1457, 1994.

GREATTI, W.F.P.; AMARAL, A.S.; SILVA, S.B.; GASPAR, L.F.J.; BARBISAN, L.F.; ROCHA, N.S. Índices proliferativos do tumor venéreo canino transmissível pelas técnicas do CEC e KI-67 na citologia aspirativa com agulha final. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.1, p. 53-59, 2004.

GUPTA, R. K.; KESARI, A. N.; MURPHY, P. S.; TANDON, V.; WATAL, G. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, p. 75-81, 2005.

HAMAGUCHI, J.; NAKAGAWA, H.; TAKAHASHI, M.; KUDO, T.; KAMIYAMA, N.; SUN, B.; OSHIMA, T.; SATO, Y.; DEGUCHI, K.; TODO, S.; NISHIMURA, S.I.

Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. **Molecular Cancer**. V.6, n.58, p. 1-9, 2007.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 110, p. 391-400, 2007.

JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZÁLEZ, M.C.; ROBLEDO, S.M.; VELEZ, L.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, n.71, p. 183-186, 2000.

KABUUSU, R.M.; STROUP, D.F.; FERNANDEZ, C. Risk factors and characteristics of canine transmissible venereal tumours in Grenada, West Indies. **Veterinary and Comparative Oncology**. V. 8, n. 1, p. 50-55, 2010.

KALEEN, M.; ASIF, M.; AHMED, Q.U.; BANO, B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetics rats. **Singapore Medical Journal**. V. 47, n. 8, p. 47-48, 2006.

KHAN, L.A.; KHANTE, G.S.; RAUT, B.M.; BODKHE, A.M.; CHAVAN, M.S.; PAGRUT, N.S.; BOBDE, S.P. Incidence of venereal granuloma and its medicinal treatment in stray dogs of Nagpur City. **Veterinary World**. V. 2, n. 1, p. 13-13, 2009.

KIM, G.S.K.; ALALI, F.; ROGERS, L.; WU, F.E.; McLAUGHLIN, J.L.; SASTRODIHARDJO, S. Two new mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, anomuricin E and muricapentocin, from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 432-436, 1998.

KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; UDEANI, G.O.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.A.; KRAMER, R.A.; MENENDEZ, A.T.; FAIRCHILD, C.R.; LANE, K.E.; FORENZA, F.; VYAS, D.M.; LAM, K.S.; SHU, Y.Z. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pure and Applied Chemistry**. V. 71, n. 9, p. 1611-1618, 1999.

KLEIN, J.L.; ROBERTS, J.D.; GEORGE, M.D.; KURTZBERG, J.; BRETNO, P.; CHERMANN, J.C.; OLDEN, K. Swainsonine protects both murine and human haematopoietic systems from chemotherapeutic toxicity. **British Journal of Cancer**, v. 80, n1-2, p. 87-95, 1999.

KNAPP, D.W.; WATERS, D.J. Opinion. **Molecular Medicine Today**. V. 3, n.1, p. 8-11, 1997.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P.P.; HÖGLINGER, G.U.; CHAMPY, P. JOUSSET, A.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; DARIOS, F.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin in toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience**. V. 121, p. 287-296, 2003.

LANNUZEL, A.; HÖGLINGER, G.U.; VERHAEGHE, S.; GIRE, L.; BELSON, S.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; POUILLAIN, P.; OERTEL, W.H.; HIRSCH, E.C.; DUBOIS, B.; RUBERG, M. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? **Brain**, v. 130, p. 816-827, 2007.

LEFEBVRE, G.N.F. ; BONAMIN, L. V. ; OLIVEIRA CM . Tratamento do TVT canino utilizando *Viscum album* em associação à quimioterapia. **Clínica Veterinária** (São Paulo), v. 12, p. 78-86, 2007.

LIAW, C.; CHANG, F.; LYN, C.; CHOU, C.; CHIU, H.; WU, M.; WU, Y. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenin from *Annona muricata*. **Journal Natural Products**, v. 65, p. 470 – 475, 2002.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; MEDINA-PIÑA, B.; REYES-ESTRADA, R.; HEINZE, G.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. **Life Sciences**, v. 78, p. 730-737, 2006.

LORIMIER, L.P.; FAN, T.M. Canine Transmissible Tumor. In: **Small Animal Clinical Oncology**. 4^a ed. Canada: Saunders Elsevier, 2007, p.799-804.

MEYER, B.N. FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.;

McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. V.45, n.5, p. 31-34, 1982.

MOHANTY, S.; HOLLINSHEAD, J.; JONES, L.; JONES, P.W.; THOMAS, D.; WATSON, A.A.; WATSON, D.G.; GRAY, A.I.; MOLYNEUX, R.J.; NASH, R.J. *Annona muricata* (Graviola): Toxic or Therapeutic. **Natural Product Communications**. V. 3, n. 1, p. 31-33, 2008.

MOREIRA, R.C.T.; COSTA, L.C.B.; COSTA, R.C.S.; ROCHA, E.A. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoreira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n.3, p. 205-211, 2002.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. **Veterinary Quarterly**, v.25, p. 101-111, 2004.

MUKARATIRWA, S.; CHITANGE, S.; CHIMATIRA, T.; MAKULEKE, C.; BHEBHE, E. Combination therapy using intratumoral bacillus Calmette-Guerin (BCG) and vincristine in dogs with transmissible venereal tumours: therapeutic efficacy and histological changes. **Journal of the South African Veterinary Association**. V. 80, n. 2, p. 92-96, 2009.

MURGIA, C.; PRITCHARD, J.K.; KIM, S.Y.; FASSATI, A.; WEISS, R.A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. **Cell**. V, 126, p. 477-487, 2006.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I.T.; TUNA, B. A Clinico-pathological Study on the Effect of Vincristine on Transmissible Venereal Tumour in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 52, p.366–70, 2005.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 727-728.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature**. V. 8, p. 147-156, 2008.

PARK, M.S.; KIM, Y.; KANG, M.S.; OH, S.Y.; CHO, D.Y.; SHIN, N.S.; KIM, D.Y. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. V. 18, p. 130-133, 2006.

PARRA, A.L.; YHEBRA, P.S.; SARDINÃS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PÉREZ, J.; DAY, M.J.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 64, p. 133-147, 1998.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p. 209-212, 2003.

PIRES, M.V.; ABREU, P.P.; SOARES, C.S.; SOUZA, B.; MARIANO, D.; SILVA, D.C.; ROCHA, E.A. Etnobotânica de terreiros de candomblé nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, n.1, p. 3-8, 2009.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine Shrimp lethality activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. **Naresuan University Journal**. V. 12, n. 2, p. 13-18, 2004.

PLUMB, D.C. **Veterinary Drug Handbook**. 4ª edição. Ed. Blackwell Publishing Company, 2002, p. 870-872.

RICE, S.A.; MANESS, I.B. Brine Shrimp Bioassays: a useful technique in biological investigations. **The American Biology Teacher**, v. 66, n.3, p. 208-215, 2004.

REAGAN-SHAW, S; NIHAL, M; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revised. **The FASEB Journal**. V. 22, p. 659-661, 2007.

RIESER, M.J.; GU, Z.M.; FANG, X.P.; ZENG, L.; WOOD, K.V.; McLAUGHLIN, J.L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. V. 59, p.100-108, 1996.

RIVERA, B; AHRAR, K.; KANGASNIEMI, M.M.; HAZLE, J.D.; PRICE, R.E. Canine transmissible venereal tumor: A Large-animal transplantable tumor model. **Comparative medicine**. V. 55, n. 4, p. 335-343, 2005.

RODASKI, S.; NARDI, A.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 3ª edição. Paraná: Maio, 2008, 305 p.

SACRAMENTO, C.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L.; BARRETTO, W. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de *Annona muricata* L. (*Annona muricata* L.L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.

SAID, R. A. ; ALBUQUERQUE, A. R. O. L. ; MUNIZ NETA, E. S. ; LAVINSKY, M. O. . Efficacy And Side Effects Of Vincristine Sulphate Treatment On Canine Transmissible Venereal Tumour. Proceedings WSAVA 2009 - **Clínica Veterinária**, v. supl., p. 162-163, 2009.

SANTOS, F.G.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, J.E.S.; CASSALI, G.D.; PAIXÃO, T.A.; MORO, L. O tumor venéreo transmissível canino - aspectos gerais e abordagens moleculares (revisão de literatura). **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 41-53, 2005.

SÃO JOSÉ, A.R. Cultivo e Mercado da Graviola. **Instituto Frutal**, 2003, 37p.

SCHLAFER, D.H.; MILLER, R.B. Female genital system. In: **Pathology of Domestic Animals**. 5ª edição, Ed. W.B. Saunders, 2007, volume 3, p. 545-548.

SILVA, M.C.V.; BARBOSA, R.R.; SANTOS, R.C.; CHAGAS, R.S.N.; COSTA, W.P. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.1, p.28-32, 2007.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A. B.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S. D.; BACILA, M. Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. **Archives of Veterinary Science**. v. 5, p. 41 – 48, 2000.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Tereza e Marilândia, ES. **Natureza on line**. v.4, n. 1, p 30-39, 2006.

TAYLOR, L. Graviola. Disponível em : <http://rain-tree.com/Graviola-Monograph.pdf>. Acessado em 15/06/2008.

VEGA, M. R. G. et al. . Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, 2007.

vonHOLDT, B. M.; OSTRANDER, E.A. The singular history of a canine transmissible tumor. **Cell**, v. 126, p. 445-447, 2006.

WANG, L.Q.; MIN, B.S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G.W.; LI, C.J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from leaves of *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 561-565, 2002.

WU, F.E.; ZENG, L.; GU, Z.M.; ZHAO, G.X.; ZHANG, Y.; SCHWEDLER, J.T.; McLAUGHLIN, J.L. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.6, p. 902-908, 1995.