

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

ALLANA CHRISTINE SANTANA FERREIRA

**EFEITO DO USO TÓPICO DE PRÓPOLIS VERDE EM CASOS DE TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – TVT_c**

Ilhéus- Bahia

2012

ALLANA CHRISTINE SANTANA FERREIRA

**EFEITO DO USO TÓPICO DE PRÓPOLIS VERDE EM CASOS DE TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – TVT_c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientadora: Prof^a Dra. Roueda Abou Said

Ilhéus – Bahia

2012

ALLANA CHRISTINE SANTANA FERREIRA

**EFEITO DO USO TÓPICO DE PRÓPOLIS VERDE EM CASOS DE TUMOR
VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – TVTc**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Ilhéus, Ba, ____/____/2012

Profa. Roueda Abou Said – Doutora
Uesc/Ba (Orientadora)

Profa. Ana Flávia Ribeiro – Doutora
Uesc/Ba

Profa. Maria Lúcia Zaidan Dagli - Doutora
USP- SP

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus, pela saúde e perseverança que tem me oferecido. Aos meus pais Antônio Carlos Ferreira e Madalena Corália Santana Ferreira que me propiciou uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível desde que sejamos íntegros, de caráter e que desistir nunca é o caminho. Aos meus irmãos que acompanharam, mesmo que à distância o meu crescimento profissional. Ao meu companheiro que no período de desenvolvimento deste trabalho me ajudou com paciência, carinho e compreensão, demonstrando que a superação nos momentos difíceis vale à pena por estarmos ao lado de quem realmente se importa com o nosso sucesso.

E como não podia deixar de estar aqui, ao meu filho uma benção que está por vir, para trazer alegrias e iluminar minha vida.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a desenvolver este trabalho, que se fizeram presentes, que foram solidárias e que dedicaram seu tempo permitindo a realização do mesmo.

Agradecimento especial faço a minha orientadora e amiga Roueda Abou Said pela sabedoria e dedicação com a qual prestou sua orientação, levando em consideração os problemas que fazem parte do contexto de um experimento clínico, sendo sensível a situações adversas que lhe foram apresentadas;

Ao professor Ivan Bezerra Allaman, pela dedicação, apoio, e pela enorme ajuda na realização das análises estatísticas, pois sem ele tenho certeza que não teria conseguido concluir minha dissertação.

A professora Kátia Moema Oliveira Rosa Sampaio pelas palavras de conforto, pelo apoio incondicional na realização das ultrassonografias, com sua experiência, dedicação, disposição e carinho;

Aos mestres que contribuíram para minha formação;

Ao professor Alexandre Dias Munhoz que sempre esteve disposto a ajudar, obrigada pela essencial ajuda e presteza nas análises laboratoriais desta pesquisa;

Aos professores Manoel Luiz Ferreira e Rosana Maria de Oliveira Clark por sempre me salvar na realização das castrações das cadelas, sempre com muita boa vontade e disposição.

As estagiárias, Milena, Lorena, Gabriela, Jacqueline, Aritana e voluntários, em especial Leandro e Roberta (os fotógrafos), do projeto TVT que participaram diretamente na execução deste trabalho.

As minhas irmãs de curso Maíra, Rejane e Joana que sempre estavam disponíveis para me auxiliar na pesquisa.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Muquita, Márcia, Fabiana, Ivo, Joilson, Lita, Dona Antônia, Aurita em especial Givaldo, e o pessoal do Laboratório de Análises Clínicas Willians, Vanessa, Ivan, Willian e Fábio, pessoas maravilhosas que me auxiliaram na realização da parte experimental desta pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo a busca de novos conhecimentos;

E concluindo agradeço aos animais que participaram desta pesquisa e que foram utilizados no intuito de melhoria das condições de saúde e vida desses nossos pacientes.

RESUMO

A própolis é um produto natural oriundo de substâncias resinosas gomosas e balsâmicas, cujas propriedades biológicas variam a depender de sua origem, e os tipos de extratos têm influência sobre a sua composição química. Objetivou-se avaliar o potencial antineoplásico de uma formulação tópica de própolis, em cadelas com tumor venéreo transmissível canino (TVTc), sendo esta avaliação realizada de forma isolada e em associação ao quimioterápico sulfato de vincristina. Também procedeu-se com a avaliação dos efeitos tóxicos decorrentes da quimioterapia nestes animais, e da influência da própolis sobre esta toxicidade. A amostragem foi composta por catorze cadelas, atendidas na rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), e distribuídas ao acaso em dois grupos experimentais (própolis e veículo), sendo monitoradas em três fases de tratamento (pré-experimental; própolis / veículo; vincristina + própolis / vincristina + veículo). Durante os tratamentos, os parâmetros de exame clínico, exame citológico, exame hematológico, exames bioquímicos (ALT, AST, uréia e creatinina) e exame ultrassonográfico foram realizados semanalmente. Verificou-se que o modelo do TVTc mostrou-se viável para a avaliação de terapias antineoplásicas *in vivo*. A formulação tópica da própolis apresentou efeito antineoplásico, de forma isolada e em associação ao quimioterápico sulfato de vincristina, acarretando em diminuição da celularidade de TVTc em exames citológicos ($p < 0,1$). O sulfato de vincristina apresentou eficácia em 100% dos casos, porém foram evidenciados sinais de toxicidade como diminuição na quantidade de leucócitos totais, plaquetas e hematócrito. A associação do tratamento própolis+vincristina foi eficiente em minimizar a toxicidade sobre os leucócitos. Foram constatadas alterações nas enzimas AST, ALT e ureia, e alterações ultrassonográficas compatíveis com hepatotoxicidade após a administração do sulfato de vincristina. A associação com a própolis não influenciou nestes parâmetros.

Palavras – chave: própolis verde, TVTc, atividade antineoplásica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. A própolis.....	9
2.1.1. Origem botânica.....	9
2.1.2. Composição Química.....	10
2.1.3. Classificação e Tipificação.....	12
2.1.4. Tipos de extratos.....	13
2.1.5 Legislação.....	14
2.1.6. Formas farmacêuticas.....	15
2.1.7. Indicações terapêuticas.....	16
2.2. Tumor Venéreo Transmissível canino (TVTc).....	20
2.2.1. Transmissão, Localização e Sinais Clínicos.....	21
2.2.2. Imunidade.....	23
2.2.3. Diagnóstico.....	24
2.2.4. Tratamento.....	27
3. REFERÊNCIAS.....	29
4. CAPÍTULO.....	37
ARTIGO: EFEITO DO USO TÓPICO DE PRÓPOLIS VERDE EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – TVTc	
4.1. INTRODUÇÃO.....	38
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
a. Própolis e obtenção da própolis em gel a 1%.....	39
b. Delineamento experimental.....	40
c. Parâmetros avaliados.....	41
d. Análise estatística.....	42
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.3.1. Parâmetros clínicos.....	43
4.3.2. Parâmetros citológicos.....	46
4.3.3. Parâmetros hematológicos.....	50
4.3.4 Alterações ultrassonográficos e Parâmetros bioquímicos.....	53
4.4 AGRADECIMENTOS.....	50
5 CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Devido à alta resistência às quimioterapias e prognóstico ruim de algumas neoplasias, a descoberta de novas estratégias terapêuticas representa um desafio constante na medicina. Neste contexto, os produtos naturais têm sido amplamente explorados, diante da perspectiva da descoberta de compostos que possuam atividades terapêuticas e que desenvolvam menor toxicidade que as terapias convencionais (VALENTE et al., 2011).

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas que apresenta propriedades terapêuticas (MARCUCCI, 1995; SFORCIN; BANKOVA, 2011). Este potencial terapêutico despertou o interesse científico e da indústria farmacêutica havendo, a partir de 1990, um aumento dos estudos relativos às questões sobre sua composição química e suas propriedades biológicas. A identificação da composição química da própolis permitiu constatar a diversidade existente entre as amostras oriundas de diferentes regiões, assim como a melhor compreensão da relação entre a presença dos compostos e sua ação terapêutica. Considerando-se só o Brasil, foram classificadas 13 tipos de própolis que possuem características distintas quanto aos seus aspectos físicos e composição química, refletindo em suas atividades biológicas (PARK, 2000; DAUGSCH et al., 2006; MARCUCCI, 2006).

Além das diferentes origens geográficas, estudos foram realizados com diversos tipos de extratos e vias de administração, além do isolamento e investigação de compostos específicos, sobretudo naqueles relacionados com sua atividade antitumoral/antineoplásica (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

O efeito antitumoral da própolis foi reportado em estudos que indicaram sua atividade citotóxica sobre linhagens celulares tumorais *in vitro*, efeito antiangiogênico *in vivo* e *in vitro* (KIMOTO et al., 1998; AWALE et al., 2008; LI et al., 2008). Estudos também indicam que a própolis exerce influência sobre a resposta imunológica do indivíduo, e que este pode ser um dos mecanismos de sua ação antineoplásica (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Ainda que diversos estudos indiquem a atividade da própolis como um agente quimiopreventivo, outros indicam a ausência desta atividade, ou até mesmo efeito promotor da carcinogênese (KAWABE et al., 2000). Os resultados

controversos sobre o efeito antineoplásico da própolis refletem a complexidade de sua composição, e também são influenciados pelo diferentes modelos experimentais utilizados para avaliar estas atividades.

Neste sentido, será apresentada uma revisão de literatura em que serão abordados os temas “própolis e tumor venéreo transmissível canino (TVTc)”, o primeiro por ser objeto deste estudo, e o segundo por se tratar do modelo experimental proposto para a avaliação da atividade antineoplásica da própolis, em condições naturalmente adquiridas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A própolis

A própolis é um produto natural oriundo de substâncias resinosas gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (MARCUCCI, 1995; BRASIL, 2001).

Quanto às características gerais, a própolis é um produto lipofílico; duro e quebradiço em temperatura ambiente, mas quando aquecido, se torna macio, flexível e pegajoso. Possui um odor característico, e apresenta colorações distintas, podendo variar de um marrom escuro a uma tonalidade esverdeada, ou um marrom avermelhado. Tais variações decorrem da localização geográfica e fonte botânica que originou a própolis (MARCUCCI, 1996).

2.1.1. Origem botânica

Em relação à origem botânica, as espécies vegetais visitadas pelas abelhas contribuem como fontes potenciais de compostos bioativos, envolvidos na produção da própolis. Para que seja identificada a origem botânica da própolis podem ser utilizados métodos diretos, através da observação da abelha coletando na fonte vegetal, ou métodos indiretos, mediante a identificação de constituintes químicos e de estruturas ou fragmentos de tecidos vegetais, encontrados em partes insolúveis da própolis (TEIXEIRA, et al., 2003).

Os vegetais apresentam metabólitos secundários que auxiliam em sua sobrevivência e perpetuação da espécie em seu meio, mas não estão necessariamente ligados à manutenção da vida do organismo. Esses metabólitos irão servir como indicadores na identificação da origem botânica da própolis (TEIXEIRA et al., 2003). É o que ocorre com a *Baccharis dracunculifolia* que como estratégia de defesa da planta, estimula a liberação de exudatos de compostos fenólicos na época da floração. E as abelhas recolhem essa substância resinosa

repleta desses metabólitos secundários que possuem atividades biológicas já conhecidas (BASTOS et al., 2011).

A partir dos estudos sobre a fonte botânica da própolis, foi possível associar as espécies vegetais predominantes em amostras de própolis de acordo com a sua localização geográfica. Em países de zonas temperadas, incluindo Europa e América do Norte, a fonte botânica predominante nas amostras foram brotos de árvores de álamo *Populus spp.*, segundo Bankova et al. (2000); enquanto em outro estudo a espécie *Populus nigra L.* foi identificada como a principal fonte de coleta pelas abelhas, estando relacionada ao tipo de própolis poplar (POPOVA et al., 2007).

Já em países tropicais, como o Brasil, a diversidade da flora é refletida nas diferentes fontes botânicas visitadas pelas abelhas (TEIXEIRA et al., 2003). Evidências fitoquímicas mostraram que a espécie *Populus Alba* foi identificada como a principal fonte vegetal da própolis oriunda da região Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (PARK et al., 2002).

A espécie *Dalbergia ecastophyllum L.* foi considerada como a fonte vegetal predominante na região Nordeste do Brasil, sendo reconhecida como a primeira leguminosa a ser fonte da própolis (DAUGSCH, et al., 2006; SILVA, B., et al., 2007). Na região Sudeste do Brasil, a espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal para a produção da própolis, nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ALENCAR et al., 2005).

Além das características geográficas, os compostos químicos presentes na própolis podem variar a depender das diferentes partes dos vegetais que serão coletados pela abelha (TEIXEIRA et al., 2003), e a depender da estação do ano, sendo que na estação chuvosa as abelhas tendem a visitar arbustos e subarbustos, enquanto no período seco extraem o néctar e resina dos vegetais lenhosos (NUNES et al., 2009).

2.1.2. Composição química

Como consequência da diversidade das fontes botânicas da própolis, existe também grande diversidade em relação à sua composição química. De forma

geral, esta possui 50-60% de bálsamos e resinas, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen (PARK et al., 2002), além de elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio, silício e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (MARCUCCI, 1996).

Para identificação desses compostos é essencial a utilização de técnicas que analisam seu perfil químico. Para tanto, pode ser empregada a técnica de espectrofotometria de absorção na região UV visível; a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) (PARK et al., 1998); a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (MARCUCCI, 1996) e a cromatografia gasosa (CASTRO et al., 2007). Podendo ser necessária a utilização de técnicas de extração combinadas para a identificação da própolis (TEIXEIRA et al., 2003; NUNES et al., 2009).

Há variação na composição da própolis, a depender da origem geográfica. Nas regiões temperadas existe uma menor variação da composição química da própolis, havendo um predomínio de flavonóides, acompanhados por quantidades menores de ácidos fenólicos e seus ésteres (BANKOVA et al., 1998; BANKOVA et al., 2002; SALOMÃO et al., 2004; POPOVA et al., 2007).

Já em países de zona tropical, a variação na composição da própolis é maior. A exemplo, a própolis oriunda da região Sul do Brasil apresentou uma composição química comum aos outros grupos brasileiros, contendo compostos fenólicos (MARCUCCI et al., 2001), como os ácidos aromáticos e flavonóides. Entretanto, um composto foi identificado (éster ácido dimetil dialil caféico) como um composto altamente alergênico, e é normalmente encontrado em própolis de clima temperado (PARK et al., 2002).

Já na região Nordeste do Brasil os compostos químicos identificados na própolis vermelha foram os flavonóides quercetina, as isoflavonas formononetina e daidzeina, os ácidos fenólicos e ácido ferúlico (CABRAL et al., 2009), e isoflavonóides (SILVA B., et al., 2007), diferindo do padrão comumente encontrado em outros tipos de própolis brasileiras (CABRAL et al., 2009).

A própolis verde brasileira, oriunda da região Sudeste do Brasil, é constituída principalmente por compostos fenólicos como ácido ferúlico, ácido cumárico e o flavonol canferide. O ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinâmico (artepillin C) foi identificado como sendo um dos compostos majoritários neste tipo de própolis (BANKOVA et al., 1998). Os flavonóides 5,7,4'- trimetoxiflavona, 5-hidroxi-7,4

dimetoxiflavanona e 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona também foram identificados (ALENCAR et al., 2005; CASTRO et al., 2007), além da identificação de flavonóides como: rutina, pinobanksin; quercetina; Kaempferol; apigenina; pinocembrina; pinobanksin-3-acetato; Chrysin; galangina; Kaempferide e Tectochrysin (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008).

2.1.3. Classificação e Tipificação

Como forma de facilitar a industrialização para o mercado nacional e internacional, foram estabelecidos parâmetros para a tipificação da própolis brasileira, baseando-se na presença de marcadores encontrados em própolis de diferentes regiões do país, sendo estas tipificadas em 12 grupos (PARK, 2000; MARCUCCI, 2006). Posteriormente a esta tipificação, identificou-se um 13º tipo, denominada de própolis vermelha, que é encontrada no litoral da região Nordeste (DAUGSCH et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Os 12 grupos de própolis identificadas no Brasil, segundo (PARK et al., 2000) e o 13º grupo (DAUGSCH et al., 2006) foram classificadas a partir dos parâmetros descritos abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das própolis brasileiras em grupos.

Classificação das própolis brasileiras			
Extrato etanólico de própolis			
Grupos	Cor	Substância solúvel (%)	Origem da própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste

Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste
Grupo 13 (AL 5)	Vermelha	--	Região Nordeste

2.1.4 Tipos de extratos

Diversos métodos de extração da própolis podem ser utilizados para a obtenção do produto para fins científicos e/ou comerciais. Um estudo realizado por Adelmman (2005) mostrou que o melhor método para a obtenção de compostos biologicamente ativos é o uso de solventes tendo como base o etanol puro, aquecimento a 45° C, e reextração por mais 24 horas, na mesma temperatura. Segundo este autor, os extratos alcoólicos apresentam maiores rendimentos de sólidos totais, teores de flavonóides e fenólicos totais e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante), quando comparados com os extratos aquosos e hidroalcoólicos (etanol 25%, 50%, 75% v/v). Entretanto, esta informação diverge entre autores. Segundo Cunha et al. (2004), os maiores rendimentos de teor de fenóis totais e maior número de componentes foram obtidos a partir do uso de etanol 70% (v/v), como solvente da própolis (CUNHA et al., 2004).

Realizou-se uma comparação entre extratos oleosos e extratos hidroalcoólicos a (30, 50, 70, 80, 95% v/v e etanol absoluto) da própolis da região do Paraná. Neste estudo, os teores de compostos fenólicos e flavonóides da própolis foram maiores nos extratos alcoólicos do que no extrato oleoso. Em contrapartida, a atividade biológica de citotoxicidade do extrato oleoso se mostrou mais efetivo, tendo um efeito antiproliferativo contra todas as linhagens de células tumorais humanas testadas, quando comparada aos extratos alcoólicos (BURIOL et al., 2009).

2.1.5 Legislação

Tendo em vista a variedade de parâmetros que podem influenciar na composição química e atividade biológica da própolis, a Legislação Agrícola Federal regulamentou padrões para a fixação da identidade própolis, estabelecendo os requerimentos mínimos de qualidade para sua comercialização como também para o comércio dos seus extratos (BRASIL, 2001). Tais requerimentos são fundamentais para garantir a qualidade, eficácia e segurança do produto final (LUSTOSA et al., 2008).

Produtos comercializados que contêm a Própolis em sua composição e que apresentam indicações terapêuticas, podem ser registrados como medicamentos específicos, sendo classificados como opoterápicos (BRASIL, 2003).

Dentre os critérios, deve haver requisitos mínimos de identidade e qualidade validados para possibilitar o controle de qualidade, como as características sensoriais (aspecto, cor e odor), requisitos físico-químicos (perda por dessecação, teor de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, densidade, viscosidade e pH; determinação do teor alcoólico (quando for o caso), atividade antioxidante, marcadores (qualitativamente e quantitativamente), teor de fenóis totais, teor de flavonóides, teor de compostos voláteis e teor de ceras; pesquisa e identificação de patógenos, aditivos, metais pesados, resíduo de pesticidas, determinação de material estranho; informação sobre a espécie da abelha e as espécies da flora presentes no local da colméia onde foi coletada a própolis (BRASIL, 2005).

Será necessária a comprovação de eficácia e segurança para indicações terapêuticas que envolvam própolis e extratos vegetais ativos, que poderá ser feita por Comprovação clínica (fase III) do efeito terapêutico e da segurança de uso da própolis utilizada no produto ou na associação. Ou essa comprovação deve ser apresentada por meio de literatura científica indexada em bases de dados com estudos realizados com a própolis específica (objeto do produto) a ser registrado, sendo necessários no mínimo oito estudos, englobando ensaios clínicos e de segurança de uso do produto. Com exceção dos produtos de uso tópico que possuam indicações de uso como antiinflamatório, antisséptico

e cicatrizante, nos quais não serão exigidos estudos de comprovação de eficácia (BRASIL, 2005).

2.1.6 Formas farmacêuticas

Diversas formas farmacêuticas da própolis estão disponíveis no mercado, dentre elas estão os extratos orais, cápsulas, enxaguatório bucal, pó, gel, entre outros. Tais formulações permitem formas diferenciadas de uso e de absorção do produto (LUSTOSA et al., 2008).

O extrato oral de própolis geralmente é fornecido como um suplemento nutricional, dessa forma, um estudo foi conduzido no Hospital e Maternidade SOCIMED para o estabelecimento da dose *in vivo* a ser utilizada por humanos adultos, que ingeriram uma formulação contendo extrato seco padronizado de própolis de *B. dracunculifolia*, por via oral. No protocolo experimental, participaram 20 voluntários de 18 a 25 anos de idade e de ambos os sexos, que ingeriram 6 cápsulas gelatinosas contendo 600 mg de extrato. Exames hematológicos foram realizados 1, 2, 4, 24h após o consumo do produto, sendo posteriormente avaliadas as concentrações plasmáticas dos compostos fenólicos. Verificou-se que os picos de concentração plasmática para os compostos analisados foram entre 1 e 4 horas. Identificou-se 16,8% do Artepillin C no plasma dos voluntários. A partir destes resultados, os autores recomendam para uma pessoa de 70kg a dose de 3 cápsulas de uma formulação comercial¹, contendo 700mg de própolis, a cada 8 horas, 1 h após as refeições (PAULINO et al., 2008b).

Além do uso oral, o uso tópico da própolis tem sido objeto de estudo em novas linhas de pesquisa e tem apresentado efeitos satisfatórios quanto à atividade antiinflamatória, em determinados tipos de extrato. Em um ensaio clínico, a própolis brasileira padronizada em gel foi utilizada para avaliar o efeito antiinflamatório sobre cervicites em mulheres. O tratamento durante sete dias resultou em diminuição significativa no número de leucócitos. Esses resultados sugerem que a própolis verde brasileira em gel pode ser um novo bioproduto a

¹ "Cápsulas Cytopropolis® Pharmanectar" é um suplemento nutricional produzido com extrato em pó de água e etanol fração da própolis de *Baccharis dracunculifolia* (própolis verde), produzido apenas no Brasil.

ser utilizado em cervicites inflamatórias crônicas em mulheres (PAULINO et al., 2010).

O uso tópico da própolis, em formato de pomada, também foi testado em relação ao seu efeito antiinflamatório em edema da pata posterior de ratos, induzido por carragenina. Nestes casos, observou-se moderado efeito antiinflamatório (NAITO et al., 2007).

Soluções tópicas também têm sido indicadas para o tratamento de condições inflamatórias de boca e faringe. A formulação solúvel em água do extrato de própolis apresentou menor irritação na mucosa oral e faríngea, e uma melhor aceitação fisiológica do que as preparações tradicionais da própolis em formulações hidroalcoólicas (SOSA et al., 2007).

2.1.7 Indicações terapêuticas

Diversos estudos comprovaram que a própolis possui atividades biológicas, sendo estas: atividade antiviral *in vitro*, contra o poliovírus e o herpesvírus (AMOROS et al., 1992); atividade antifúngica de extratos hidroalcoólicos (5% a 30%) e extratos hidroglicólicos (30% a 50%) (LONGUINI et al., 2007); atividade antiinflamatória (PAULINO et al., 2008a); atividade antibacteriana de extratos alcoólicos (PARK et al., 1998; SALOMÃO et al., 2004) e extrato oleoso (BURIOL et al., 2009).

Além disto, os extratos da própolis e/ou seus compostos isolados podem estimular ou suprimir determinados eventos da resposta imune. Essa ação dúbia se reflete na grande variedade da composição química entre as amostras de própolis, podendo torná-la potencialmente aplicável como uma substância imunoestimulante, ou no combate aos processos inflamatórios indesejáveis ou às neoplasias (FISCHER, 2008).

Extratos aquosos e metanólicos da própolis, de diferentes regiões do Brasil, China, Peru e Holanda, foram testados quanto a sua capacidade em remover radicais livres; em promover citotoxicidade sobre culturas celulares de carcinoma de cólon murino e fibrossarcoma humano; e de hepatoproteção em modelo de indução de morte celular por D-galactosamina (D-GalN)/fator de necrose tumoral (TNF- α). Observou-se que os extratos aquosos possuíam ação maior ação antioxidante,

enquanto que os extratos metanólicos possuíam maior atividade citotóxica e atividade hepatoprotetora no modelo proposto (BANSKOTA et al., 2000).

Os extratos alcoólicos da própolis chilena, nas concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{l}/\text{mL}$) exerceram atividade citotóxica sobre linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon, células de adenocarcinoma da próstata e do carcinoma epidermóide da boca (RUSSO et al., 2004).

Há relatos de que a citotoxicidade exercida pela própolis possui seletividade sobre células tumorais. O extrato da própolis portuguesa, nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inibiu seletivamente a proliferação *in vitro* de carcinoma de células renais, sem apresentar toxicidade sobre células renais normais (VALENTE et al., 2011).

A atividade citotóxica de extrato oleoso da própolis oriunda do Paraná-Brasil, obtido a partir de 5 gramas de própolis triturada com 25ml de óleo de canola, foi analisada, e demonstrou atividade citotóxica contra todas as linhagens de células tumorais testadas, obtendo mais especificidade contra aquelas do cólon e glioblastoma. Em conclusão, o óleo vegetal de canola foi capaz de extrair substâncias bioativas responsáveis pela atividade citotóxica observada (BURIOL et al, 2009).

Culturas celulares de Tumor Venéreo Transmissível canino (TVTc) serviram de modelo para um estudo utilizando o extrato hidroalcoólico a 70% da própolis oriunda de Botucatu - São Paulo, bem como seus compostos isolados para avaliação de sua atividade de citotoxicidade. Observou-se significativa citotoxicidade sobre linhagens incubadas com extrato hidroalcoólico de própolis na concentração de 100 μg , após 6 horas do tratamento. A eficácia do extrato em concentrações menores também foi observada, porém o tempo para induzir esse efeito foi maior, a saber, após 24 horas, para 50 μg ; e 48 horas para 25 μg (BASSANI-SILVA et al., 2007).

Estudos apontam para atividades antioxidantes da própolis, Foram avaliados diferentes extratos etanólicos de própolis de várias regiões do mundo como da Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China Hungria, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Uzbequistão, em uma concentração final de 10mg/ml, quanto ao potencial antioxidante. Observou-se maior ação antioxidante em extratos que possuíam maior teor de flavonóides em sua

composição, como foi o caso principalmente da Argentina e China, demonstrando que os flavonóides estão diretamente ligados a esta atividade (KUMAZAWA, et al., 2004).

Além deste estudo, outros autores atestaram o efeito antioxidante de amostras de própolis originárias do Chile, Russo et al. (2004), do Brasil, amostras de própolis vermelha brasileira, e seus compostos fenólicos, Cabral et al. (2009) e de Portugal (VALENTE et al., 2011).

Em relação aos estudos in vivo, os derivados de própolis solúveis em água (WSDP), foram avaliados quanto sua atividade antimetastática. As metástases no pulmão foram geradas pelo implante 2×10^5 células tumorais viáveis, aplicadas via intravenosa em camundongos, e o WSDP foi administrado por via intraperitoneal, nas doses de 50 ou 150 mg/kg, após a inoculação das células tumorais. Observou-se redução do número de metástases no pulmão e do crescimento da neoplasia, nos animais tratados com WSDP, em relação aos animais do grupo controle. Relacionou-se esta atividade com a produção do fator de ativação de linfócitos por macrófagos peritoneais (ORŠOLIĆ; BAŠIĆ, 2003).

Os efeitos do WSDP foram avaliados sobre o desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich em camundongos. Foi realizada a administração, por via oral, de 50mg/kg de WSDP, 2 horas antes da aplicação por via intraperitoneal de células tumorais. Observou-se inibição do crescimento tumoral e redução do número total de células tumorais na cavidade peritoneal. Provavelmente, a eficácia da atividade antitumoral foi devido ao aumento da atividade dos macrófagos (ORŠOLIĆ; BAŠIĆ, 2005b).

Camundongos portadores de melanoma, submetidos ao estresse de imobilização, após a administração de 200mg/kg por via oral do extrato hidroalcoólico de própolis a 70%, produziram citocinas IL2 e IL10, indicando a atividade imunomoduladora da própolis (MISSIMA et al., 2009).

Carvalho et al. (2011) avaliaram a atividade antineoplásica do extrato oleoso da própolis do Paraná, através da inoculação de células tumorais por via subcutânea na virilha de camundongos. Um dia após a inoculação, o extrato de própolis, nas concentrações de 50 e 80mg/kg, foram aplicados por via intraperitoneal, durante 7 dias. Ao 8º dia, os camundongos foram sacrificados e os

tumores foram pesados e comparados com o controle. Os resultados mostraram que o extrato inibiu o crescimento do Sarcoma 180 em camundongos.

A avaliação da atividade antineoplásica da própolis também foi efetuada em associação aos quimioterápicos. Neste contexto, Benkovic et al. (2007) avaliaram o efeito da própolis da Croácia sobre células do Tumor Ascítico de Ehrlich, inoculadas em camundongos. Após a inoculação, foram administrados o extrato alcoólico e um derivado hidrossolúvel da própolis, por via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, durante 3 dias consecutivos, em associação ou não ao quimioterápico Irinotecan. Observou-se ação sinérgica de compostos fenólicos e flavonóides (presentes no extrato) com o quimioterápico Irinotecan, apresentando uma maior atividade antineoplásica, quando comparado com o uso do quimioterápico sozinho. Esses resultados constituíram em maior tempo de sobrevivência dos animais e regressão do tumor.

Um modelo experimental utilizando ratos com carcinoma transplantável mamário foi empregado para avaliar a ação do WSDP em associação aos agentes quimioterápicos, para o tratamento de citopenias induzidas por quimioterapia. Também foi avaliado seu efeito antimetastático, quando empregado isoladamente e em associação aos agentes quimioterápicos. As metástases pulmonares foram induzidas pela aplicação de células tumorais, por via intravenosa, nos ratos. Em sequência, foi administrado o WSDP (50 ou 150mg/kg) por via intraperitoneal. Verificou-se efeito antimetastático significativo, do WSDP como agente único, e também quando a administração foi feita em combinação com o quimioterápico Epirrubicina, em que a metástase foi inibida profundamente, havendo um efeito sinérgico. Outro resultado encontrado foi que o tratamento em combinação manteve os parâmetros sanguíneos em normalidade, diferente dos animais tratados apenas com o quimioterápico, em que a citopenia foi observada. Esses resultados demonstram que a associação do extrato de própolis com o quimioterápico tende a maximizar a atividade antineoplásica e minimizar os efeitos de toxicidade hematológica pós-quimioterapia (ORŠOLIĆ; BAŠIĆ, 2005a).

Ainda que existam estudos indicando o potencial antineoplásico da própolis, seu efeito ainda permanece controverso. Ozkul et al (2005) avaliaram as taxas médias de micronúcleo e do índice mitótico de linfócitos de humanos não-fumantes através da incubação destas células com extratos de própolis em

concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,7 e 1,0 ml. Observou-se aumento de micronúcleos em concentrações elevadas de própolis.

Em estudo de hepatocarcinogênese química experimental, utilizando roedores, observou-se que tanto o extrato aquoso de própolis quanto o extrato etanólico de própolis exerceram atividade promotora da hepatocarcinogênese, na concentração de 0,1%, aumentando a incidência de lesões pré-neoplásicas. Curiosamente, o mesmo resultado não foi observado na concentração de 0,5%, em ambos os extratos (KAWABE et al., 2000).

Também foi avaliada a atividade quimiopreventiva do extrato de própolis verde brasileira a 0,1% contra o desenvolvimento de carcinogênese química induzida por diatílnitrosamina, não sendo observada qualquer diferença significativa sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas entre os animais que receberam própolis e o grupo controle (SAID et al., 2010).

Estes resultados controversos demonstram as variações de atividades biológicas da própolis, que decorrem tanto das diferentes amostras testadas, quanto dos modelos experimentais propostos. Neste contexto, é de fundamental importância que haja a identificação da composição química do extrato a ser analisado, assim como a integração destes resultados aos estudos *in vitro* e *in vivo*.

Os modelos que usualmente são empregados para a avaliação do potencial antineoplásico de produtos naturais *in vivo* utilizam-se de animais de laboratório e da indução experimental das neoplasias. Embora estes modelos sejam úteis, estes não mimetizam os eventos neoplásicos de ocorrência natural (ETTLIN e PRENTICE, 2002). Como uma possibilidade para tais condições, pode ser utilizado como modelo o TVTc naturalmente adquirido.

2.2 Tumor venéreo transmissível canino (TVTc)

O Tumor Venéreo Transmissível canino (TVTc) é conhecido também como Sarcoma Venéreo Transmissível, Sarcoma de Sticker, Granuloma Venéreo, Condiloma canino, entre outros (STEPHEN, 2007). É uma neoplasia que acomete o cão doméstico (*Canis familiares*) e potencialmente outros canídeos sociais como o lobo (*Canis lupus*) e o coiote (*Canis latrans*) (VONHOLDT; OSTRANDER, 2006).

Beebe e Ewing (1906) descreveram esta neoplasia como sendo um linfossarcoma infeccioso em cães, e constataram que as células desta neoplasia mostravam uma capacidade de existência independente e infectividade que não eram observadas em nenhum outro processo tumoral conhecido.

Com base em análises de variância de microssatélites e DNA mitocondrial pôde-se estimar que o TVTc provavelmente originou-se de um clone ancestral, e que a natureza inata de alguns grupos de lobos poderia ter facilitado a propagação inicial desta neoplasia. Essas análises também demonstraram que a linhagem do TVTc, data de 250 a 2500 anos (MURGIA et al., 2006), representando a mais antiga linhagem celular neoplásica conhecida em animais (FASSATI; MITCHISON, 2010). Estudo utilizando técnica de imunofenotipagem sugeriu que o TVTc tem uma origem mesenquimal e histiocitária (MARCHAL et al., 1997).

A célula somática do cão (*Canis familiares*) possui 78 cromossomos, sendo 76 cromossomos autossômicos e acrocêntricos e dois sexuais metacêntricos. Enquanto que nas amostras celulares de TVTc, espontâneas e transplantadas experimentalmente, oriundas de diferentes áreas geográficas do mundo encontrou-se cariótipos com números de cromossomos de 58-59 cromossomos, com 13-17 metacêntricos e 42 acrocêntricos (PUROHIT, 2009). E que esta cariotipagem era semelhante entre as diferentes áreas geográficas, sugerindo que o TVTc é transmitido de um animal para outro por transplantação de células viáveis (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004).

A natureza contagiosa do TVTc levou a numerosas tentativas de demonstrar um agente causador oncogênico viral, porém um agente etiológico que originalmente tenha induzido o TVTc ainda é desconhecido (MUKARATIRWA; GRUYS, 2004). Evidências citogenéticas mostram que as próprias células neoplásicas se comportam como agentes infecciosos, sendo responsáveis pela transmissão do TVTc (MURGIA et al., 2006).

2.2.1 Transmissão, Localização e Sinais clínicos

O TVTc apresenta distribuição mundial, mas sua ocorrência é maior em países tropicais e subtropicais (DAS; DAS, 2000). Sua transmissão normalmente

ocorre através do coito, ou pode ser transplantado mecanicamente por meio de lambeduras, mordeduras ou o ato de farejar a área neoplásica (STEPHEN, 2007).

Estudos demonstram a influencia hormonal no crescimento de neoplasias do trato genital em humanos e animais. Uma neoplasia, normalmente é originada de um grupo de células do indivíduo que sofrem mutação ou diferenciação, resultando em um crescimento celular descontrolado. Porém o TVTc, não decorre de células neoplásicas do indivíduo, mas da transplantação de células com cariótipo diferenciado, em tecido que foi submetido a um trauma, não sofrendo a influencia de receptores de esteróides para o crescimento tumoral (DE BRITO et al., 2006).

O tumor venéreo é mais comum em animais adultos, férteis, com idade média de três a cinco anos, relacionada pelo período correspondente a maior maturidade e atividade sexual, sem diferença entre as raças (SOUSA et al., 2000; AMARAL et al., 2004; SILVA, M. et al., 2007). Em estudos de prevalência realizados, os animais sem raça definida (SRD) foram considerados como um grupo de maior risco devido à existência de mais exemplares desses cães, quando comparados aos cães de raça definida (SILVA, M. et al., 2007); e por esses animais habitarem áreas com alta concentração de cães abandonados, e terem maior possibilidade de contato com animais portadores de TVTc (SOUSA et al., 2000).

Naturalmente, a ocorrência da doença é mais comum em fêmeas. Essa observação pode estar relacionada ao comportamento das fêmeas em aceitar mais de um macho durante o período fértil. Deve-se considerar ainda que nessa fase do ciclo estral ocorre o intumescimento vulvar, com maior suprimento sanguíneo para a genitália, favorecendo a implantação de células tumorais (SILVA, M. et al., 2007).

Quanto à localização anatômica do tumor existe uma maior frequência em acometer a genitália (vagina, vulva, prepúcio e pênis), devido à transmissão ser normalmente pelo coito. A transmissão cutânea pode ocorrer após uma implantação mecânica das células de TVTc, por lambedura ou contato direto em locais onde houve abrasão cutânea (SILVA, M. et al., 2007).

Os casos de metástase são raros, e ocorrem normalmente por via hematogênica ou linfática em órgãos abdominais, linfonodos ilíacos internos e externos, de animais que não foram tratados no período de dois meses (SOUSA et al., 2000). A metástase ocorre normalmente em casos de condições fisiológicas

débeis do cão, como nos casos de imunossupressão, subnutrição e animais jovens ainda não imunocompetentes ou idosos (PARK et al., 2006).

Os sinais clínicos encontrados são consequentes à presença do tumor, que produz descarga vaginal ou prepucial serosanguinolentas ou sanguinolentas, com lambadura de genitália, tumefação genital, odor ou aparecimento de massas neoplásicas visíveis, disúria, lesão ulcerativa na pele e dificuldade de exposição peniana (DAS; DAS, 2000; SILVA, M. et al., 2007). A descarga serosanguinolenta ou sanguinolenta pode ser confundida com estro, uretrite, cistite e prostatite (DAS; DAS, 2000).

Macroscopicamente, o TVTc pode possuir formatos de couve-flor, pedunculado, nodulado, papilar ou multipapilar. O tamanho pode variar de 5mm a 10 cm. A superfície pode se apresentar como lisa, rugosa, ulcerada ou com necrose. A coloração pode variar de branco-acinzentada à avermelhada, a depender da vascularização (DAS; DAS, 2000).

2.2.2 Imunidade

O TVTc possui um padrão de desenvolvimento, caracterizado por fases, que incluem um crescimento progressivo, seguido por uma fase estática e posteriormente uma fase de regressão (FASSATI; MITCHISON, 2010).

Na fase de crescimento progressivo, o sistema imune é incapaz de destruir os oncócitos, que escapam da vigilância imunológica, permitindo o crescimento do tumor. A inoculação de células de TVTc induz a redução de linfócitos B na circulação periférica. A redução ocorre devido à ação de uma proteína tóxica produzida pelas células do TVTc, que induz a apoptose desses linfócitos. Esse mecanismo explica como o TVTc afeta a imunidade humoral na fase de crescimento progressivo (LIAO et al., 2003).

Na fase de regressão, ocorre a redução da proliferação das células tumorais, aumento da apoptose, coincidindo ou sendo resultante da infiltração por linfócitos T, e substituição do estroma tumoral por tecido fibroso (GONZALES et al., 2000). Não apenas os linfócitos T, mas os macrófagos, bem como as células B, células plasmáticas que produzem IgG, IgG2 e IgG4 podem promover a regressão

do TVTc. Isto sugere que o sistema imunológico desempenhe um papel importante na regressão tumoral (PÉREZ, RT al., 1998; FASSATI; MITCHISON, 2010). Essas características do tumor podem estar associadas tanto a regressão espontânea quanto a regressão por quimioterapia (GONZALES et al., 2000).

Demonstrou-se que na fase de regressão ocorre a expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), classe I e II, pela infiltração de linfócitos e macrófagos e por números variável de células de TVTc, fato que não ocorre na fase de crescimento progressivo (PÉREZ et al., 1998; HSIAO et al., 2002; FASSATI; MITCHISON, 2010).

Em cães em que o TVTc foi transplantado experimentalmente e que posteriormente houve a remissão espontânea, estes se tornam imunes a reinoculação, por apresentarem anticorpos que reconhecem os antígenos presentes na superfície de células de TVTc. A expressão de antígenos MHC classe II por células de TVTc promove a produção de anticorpos de TVTc específicos, que desempenham um importante papel para proteção contra uma reinoculação subsequente (FASSATI; MITCHISON, 2010).

A remissão espontânea do TVTc relaciona-se diretamente com a imunidade do animal, sendo frequente em animais adultos e imunocompetentes. Microscopicamente observa-se infiltração de linfócitos, presença de necrose, apoptose celular e um processo de fibrose (BEEBE; EWING, 1906; DRUMOND et al., 2008). O processo da apoptose está relacionado com a interação das proteínas p53 e p63, envolvidas na supressão do TVTc e conseqüentemente no prognóstico dessa neoplasia (STOCKMANN et al., 2010).

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo do TVTc pode ser realizado mediante o exame histopatológico ou o exame citológico. O exame histopatológico é altamente confiável, permite um melhor detalhamento da arquitetura do processo neoplásico e suas relações com tecido circunjacentes, caracteriza melhor as variações de diferenciação e tipos celulares (MAGALHÃES et al., 2001). Mas trata-se de um método invasivo e oneroso (AMARAL et al., 2004).

Já o exame citológico é um recurso diagnóstico simples, minimamente invasivo, indolor, rápido, seguro, eficaz, de baixo custo e não requer o uso de equipamento sofisticado, sedação ou anestesia para sua realização (AMARAL et al., 2004; SIMERMANN, 2009).

Para coleta das amostras do exame citológico pode ser utilizada a técnica de citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) e *imprint* e/ou esfoliação com *swabs* em lâmina de vidro (AMARAL et al., 2004). Em animais que apresentam massas intra-abdominais, recomenda-se a utilização de CAAF guiada por ultrassonografia, permitindo a identificação, e determinação da localização e da distribuição das lesões no órgão acometido (AMARAL et al., 2004).

As características citológicas do TVTc caracterizam-se pela presença de células predominantemente arredondadas, volumosas, em arranjo discreto, com núcleo arredondado ou ovalado, e cromatina grosseira (SHARKEY, WELLMAN, 2011). O nucléolo pode ser único ou duplo, grande e excêntrico, o citoplasma é levemente basofílico claro, finamente granular, com vacúolos claros bem definidos. Os vacúolos possuem grande importância diagnóstica, uma vez que diferenciam o TVTc de outras neoplasias de células redondas (SANTOS et al., 2001).

Figuras de mitose, corpos apoptóticos, células epiteliais vaginais, eritrócitos, bactérias (em alguns casos) e infiltrado inflamatório também são encontrados no exame citológico (SANTOS et al., 2001; NAK et al., 2005). As células inflamatórias são constituídas principalmente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (SANTOS et al., 2001).

Amaral et al. (2004) propuseram que, de acordo com as características morfológicas observadas ao exame citológico, o TVTc fosse classificado como sendo do tipo plasmocítico, linfocítico e misto. O padrão linfocítico inclui células predominantemente redondas, com citoplasma escasso, finamente granular, presença de vacúolos, núcleo redondo com cromatina grosseira e a presença de um ou dois nucléolos evidentes; enquanto que no padrão plasmocítico, as células possuem morfologia ovóide, uma menor relação núcleo:citoplasma e núcleo excêntrico (AMARAL et al., 2004; GREATTI et al., 2004). O padrão misto é classificado quando ocorre uma celularidade mista entre os tipos celular linfocítico e plasmocítico e nenhum dos dois ultrapassa 59% do total de células (AMARAL et al., 2007).

A elevada ocorrência do aspecto celular plasmocítico, especialmente naqueles de localização extragenital e em metástase, independentemente do sexo, sugere que esse tipo celular associa-se a maior malignidade (AMARAL et al., 2004, 2007). Além disso, quando está associado à ausência de infiltrado inflamatório linfocitário, apresentam maior resistência ao protocolo quimioterápico convencional, quando comparado com o tipo linfocítico que possui maior eficácia ao tratamento (SIMERMANN, 2009).

Outro estudo afirma que a expressão de glicoproteína-p pelo TVTc pode estar envolvida na resistência à quimioterapia, e a maior expressão pelo tipo celular plasmocítico, indicando maior agressividade desta linhagem (GASPAR et al., 2009).

Além de ter importância para o diagnóstico do TVTc, os exames citológico e histopatológico também permitem o monitoramento da eficácia da terapia, que pode ser acompanhada pela diminuição no número de células tumorais típicas, pelo aumento da vacuolização citoplasmática, diminuição da taxa de proliferação celular e aumento do índice de células apoptóticas (NAK et al., 2005).

A taxa de proliferação celular pode ser avaliada por meio de marcadores, que podem ser úteis para a avaliação do comportamento biológico da neoplasia, possibilitando mudanças a respeito da sensibilidade de protocolos quimioterápicos. Os métodos de avaliação do índice mitótico, métodos citoquímicos (concentração eletrolítica crítica- CEC) e imunocitoquímicos (Ki-67, clone MIB-1) utilizados se mostram eficientes e aplicáveis em amostras citológicas de TVTc (GREATTI et al., 2004).

Outros métodos utilizados como diagnóstico diferencial do TVTc são a imunohistoquímica (com marcadores de superfície e intracitoplasmático para linfócitos) (SANTOS et al., 2005) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que muitas vezes são associados ao exame citológico para determinar a sensibilidade e especificidade neoplásica (SHARKEY; WELLMAN, 2011). Tais técnicas são especialmente úteis quando se faz necessário o diagnóstico diferencial com outras neoplasias como linfoma, mastocitoma, histiocitoma canino cutâneo, melanoma amelanótico (PARK et al, 2006).

A cintilografia foi também utilizada para a localização de tumores em cães acometidos pela forma cutânea do TVTc. Por ser uma técnica não invasiva, pode

constituir-se uma técnica promissora para a avaliação do grau de disseminação e estadiamento dos casos de TVTc (CASTELO-BRANCO et al., 2008).

2.2.4 Tratamento

O TVTc possui uma natureza diversa, podendo tanto apresentar regressão espontânea quanto desencadear metástases. Ainda que tenha este potencial maligno, é uma neoplasia que possui capacidade de resposta a diversas modalidades de tratamento (NAK et al., 2005) como a eletroquimioterapia (SPUGNINI et al., 2008), radioterapia, imunoterapia, criocirurgia e ablação por radiofrequência (STEPHEN, 2007). Entretanto, o tratamento de escolha é a quimioterapia, possuindo grande eficácia com a monoterapia a base de sulfato de vincristina, na dose de 0,5 mg/m² a 0,75 mg/m², administrado por via intravenosa por bolus rápido, uma vez por semana. Esta é uma terapia relativamente segura e barata, fornecendo uma resposta completa em 90 a 95% dos cães tratados, após aproximadamente 2 a 6 semanas de tratamento (NAK et al., 2005).

Segundo Scarpelli, et al. (2010) o tempo de tratamento com o sulfato de vincristina até a remissão clínica completa pode variar. Dessa forma, avaliaram-se possíveis fatores preditivos que influenciariam no tempo de tratamento quimioterápico. O estudo demonstrou que maior volume de tumor, idade mais avançada e tratamento durante os meses quentes e chuvosos atrasaram a resposta à quimioterapia, enquanto que o sexo, peso ou raça não foram relevantes. Esses resultados devem ser investigados quanto a um sistema de vigilância imunológica diminuída, resultando em atrasos na regressão do tumor.

Quando existe resistência à terapia com vincristina, a doxorrubicina pode ser utilizada na dose de 25 a 30 mg/m² IV a cada 21 dias, durante dois a três ciclos (NAK et al., 2005; SILVA, M. et al., 2007).

A quimioterapia com a vincristina para o tratamento do TVTc pode induzir a efeitos colaterais em alguns indivíduos, como complicações hematológicas, neurológicas, gastrointestinais (anorexia, diarreia, perda de peso), dermatológicas (alopecia generalizada e localizada), feridas no tecido de aplicação, devido ao extravasamento do líquido, decorrentes da toxicidade do fármaco antineoplásico.

Leucopenia, neutropenia, linfocitose, trombocitopenia, anemia normocítica normocrômica podem ser observados (NAK et al., 2005).

3. REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. "Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante." **Tese** - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2005.

ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

AMARAL, A.S. et al. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 167-171, 2004.

AMARAL, A. S. et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor . **Revista Portuguesa, Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 563-564, 2007.

AMOROS, M. et al. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 181-189, 2008.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.

BANKOVA, V.S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V. et al. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. **Z. Naturforsch**, v. 57, p. 530-533, 2002.

BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246, 2000.

BASSANI-SILVA, S. et al. Propolis effect *in vitro* on canine Transmissible Venereal Tumor cells, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 261-265, 2007.

BASTOS, E. M. A. F. et al Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 727-734, 2011.

BEEBE, S.P; EWING, J. A study of the so-called infectious lymphosarcoma of dogs. **Journal of Medical Research**, v. 15, p. 209-227, 1906.

BENKOVIC, V. et al. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 5, p. 292-297, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003). Resolução RDC nº 132, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da União, de 02 de Outubro de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm#_Acesso em: 10 de fevereiro de 2012.

BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoral activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CASTELO-BRANCO, Paulo S. M. et al . Uso da ^{99m}Tc-Timina na identificação de metástases de tumor venéreo transmissível canino com apresentação cutânea. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 367-370, 2008 .

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

DAUGSCH, A.A. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, n. 89, p. 2006. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>, acessada em julho de 2011.

DE BRITO, C. P. et al. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in vaginal and tumor tissues of healthy and TVT-affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 β and progesterone. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1587-1592, 2006.

DRUMOND, K. O. et al. Regressão espontânea de tumor venéreo transmissível canino. Relato de Caso. **Pubvet**, v. 2, n. 38, p.1982-1263, 2008.

FASSATI, A.; MITCHISON, N.A. Testing the theory of immune selection in cancers that break the rules of transplantation. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 59, p. 643-651, 2010.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela Própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

GASPAR, L. F. J. et al. Imunorreatividade à glicoproteína-p nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino. **Veterinária em Foco**, v.6, p.140-146, 2009.

GREATTI, W. et al. Índices proliferativos do tumor venéreo canino transmissível pelas técnicas do CEC e ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 53-59, 2004.

GONZALEZ, C. M. et al. 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, n. 4, p. 241-248, 2000.

HSIAO, Y.-W. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 1–2, p. 19-27, 2002.

KAWABE, M. Modifying effect of propolis on MeIOVX promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two stage carcinogenesis model multiple carcinogen initiation. **Nutrition and Cancer**, v.37, p.179-186, 2000.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection Prevention Journal**, v.6, p.506-515, 1998.

KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 181-189, 2008.

LIAO, K.-W. et al. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 3–4, p. 149-162, 2003.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, p.388-395, 2007.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MAGALHAES, A. M. et al. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 23-32, 2001

MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1–2, p. 1-11, 1997.

MARCUCCI, M. C, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n.5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C, Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v.1, n. 03, p. 36-46, 2006.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R. et al. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 178-181, 2008.

MUKARATIRWA S.; GRUYS E. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. **A review. Vet Q**, v. 25, p. 101-111, 2003.

MURGIA, C. et al. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 477-487, 2006.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 452-456, 2007.

NAK, D. et al. A Clinico-pathological Study on the Effect of Vincristine on Transmissible Venereal Tumour in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 7, p. 366-370, 2005.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 265-273, 2003.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005a.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 37-45, 2005b.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; EROĞLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, n. 10, p. 742-747, 2005.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K. et al. Classificação das própolis Brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, n.58, 2000.

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, M. S. et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 130-133, 2006.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008a.

PAULINO, N. et al. Avaliação da biodisponibilidade do Artepillin C em humanos após o consumo de própolis de *Bacharis dracunculifolia*. In: **40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia. Anais do Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008b.

PAULINO, N. et al. Clinical evaluation of the anti-inflammatory effect of *Bacharis dracunculifolia* propolis gel (patent PI 0904121-4) on cervicitis. In: **42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto. Anais do 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. São Paulo : Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

PÉREZ, J. et al. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 133-147, 1998.

POPOVA, M. et al. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin* **Apidologie**, v. 38, p.306– 311, 2007.

PUROHIT, G. N. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Review. **The Internet Journal of Veterinary Medicine**, v. 6, p. 1-9, 2009.

RUSSO, A. et al. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. **Life Sciences**, v. 76, n. 5, p. 545-558, 2004.

SALOMÃO, K, et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p. 87–92, 2004.

SANTOS, F. G. A. et al. O tumor venéreo transmissível canino –Aspectos gerais e abordagens moleculares (Revisão de Literatura). **Bioscience Journal**, v. 21, p.41-53, 2005.

SCARPELLI, K. C.; VALLADÃO, M. L.; METZE, K. Predictive factors for the regression of canine transmissible venereal tumor during vincristine therapy. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p. 362-363, 2010.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHARKEY, L. C.; WELLMAN, M. L. Diagnostic Cytology in Veterinary Medicine: A Comparative and Evidence-Based Approach. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2011.

STEPHEN, J. W. et al. Miscellaneous Tumors. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders. p.785-823, 2007.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Advance Access Publication**, v.7, p. 313-316, 2007a.

SILVA, M.C.V. et al. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, p.28-32, 2007b.

SIMERMANN, N. F. S. “Sulfato de vincristina no tratamento do Tumor Venéreo Transmissível frente à caracterização citomorfológica”. **Dissertação** - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.

SOSA, S. et al. Topical Antiinflammatory Activity of an Innovative Aqueous Formulation of Actichelated® Propolis vs Two Commercial Propolis Formulations. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 823–826, 2007.

SOUSA, J. et al. 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.

SPUGNINI, E. P. et al. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 27, p. 1-5, 2008.

STOCKMANN, D. et al. Canine Transmissible Venereal Tumors: Aspects Related to Programmed Cell Death. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, p. 67-75, 2011.

TEIXEIRA, E.W. et al. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **B. Indústria animal**, v.60, p.83-106, 2003.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 86-92, 2011.

VONHOLDT, B. M.; OSTRANDER, E. A. The Singular History of a Canine Transmissible Tumor. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 445-447, 2006.

4. CAPÍTULO

A metodologia, resultados e discussões serão apresentados em forma de capítulo que está constituído por artigo científico que será publicado em periódico.

EFEITO DO USO TÓPICO DE PRÓPOLIS VERDE EM CASOS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO – TVTc

4.1 INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural oriundo de substâncias resinosas gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exudatos de plantas, sendo acrescidas secreções salivares, cera e pólen para a elaboração final do produto (MARCUCCI, 1995; BRASIL, 2001). Tem a função de vedação e de proteção da colméia, evitando a decomposição de insetos em seu interior (MARCUCCI, 1995).

É considerada como um produto natural com potencialidade para o uso na medicina humana e animal (BANKOVA et al, 2000), sendo tradicionalmente utilizada como suplemento dietético e como pomada cicatrizante.

Além do uso tradicional, estudos corroboraram quanto suas propriedades de citotoxicidade sobre diversas linhagens tumorais (BANSKOTA et al., 2000; RUSSO et al., 2004; BURIOL et al., 2009; VALENTE et al., 2011), atividade antineoplásica (BENKOVIC et al. 2007; CARVALHO et al., 2011) e atividade antimetastática sobre neoplasias experimentalmente induzidas (ORŠOLIĆ E BAŠIĆ, 2005b).

Também foi descrito que o extrato aquoso derivado de própolis brasileira reduziu o processo de angiogênese *in vitro* e *in vivo*, em modelos experimentais induzidos (CHIKARAISHI et al., 2010), e que a própolis também exerce ação imunomoduladora (SFORCIN, 2007), e possui atividade antioxidante, atuando na remoção de radicais livres (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009). Tais atividades podem constituir-se como mecanismos de ação para seu efeito antineoplásico.

Deve-se ressaltar que, embora existam estudos que atestem quanto ao potencial terapêutico da própolis, as questões quanto à origem das amostras e, tipos de extratos influenciam diretamente sobre a composição química deste produto, e conseqüentemente sobre suas atividades biológicas.

Outros parâmetros que também devem ser avaliados relacionam-se às doses/concentrações, vias de administração e modelos experimentais empregados.

Usualmente, a avaliação do potencial antineoplásico de produtos naturais *in vivo* utiliza-se de animais de laboratório e da indução experimental das neoplasias. Embora estes modelos sejam úteis, eles não mimetizam os eventos neoplásicos de ocorrência natural, sendo necessária a integração destes resultados com estudos clínicos, em que a avaliação destes produtos seja realizada sobre neoplasias não induzidas experimentalmente (ETTLIN e PRENTICE, 2002).

Desta maneira, objetivou-se a realização de um estudo sobre o potencial antineoplásico de uma formulação tópica da própolis, em cadelas com tumor venéreo transmissível canino (TVTc), sendo esta avaliação realizada de forma isolada e em associação ao quimioterápico sulfato de vincristina. Também procedeu-se com a avaliação dos efeitos tóxicos decorrentes da quimioterapia nestes animais, e da influência da própolis sobre esta toxicidade.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

a. A própolis e obtenção da própolis em gel a 1%

A amostra da própolis foi proveniente do município de Caeté – Minas Gerais, e coletadas como um pool de resinas extraídas de apicultores cadastrados, cuja principal origem botânica é a espécie *Baccharis dracunculifolia*.

Anteriormente a este estudo, foi realizada a identificação dos compostos químicos desta amostra, pela técnica de HPLC, mostrando níveis elevados de compostos fenólicos (mg/g) de ácido cumárico (3,81 mg/g), rutina (9,87 mg/g), pinobanksin (3,48 mg/g), a quercetina (2,15 mg/g), caempferol (0,78 mg/g), apigenina (1,86 mg/g), pinocembrina (22,55 mg/g), pinobanksin-3-acetato (4,10 mg/g), crisina (2,49 mg/g), galantina (4,14 mg/g), kaempferide (5,59 mg/g), tectochysin (2,90 mg/g), Artepilin C (87,97 mg/g), totalizando 151,69 mg/g de extrato seco.

O gel de própolis verde 1% foi produzido a partir do extrato em pó diluído em frações de água e etanol. A base do produto é composta por gel aristoflex 2,5%, que inclui em sua composição phenonip, aristoflex AVC, óleo lubrajel e água destilada.

b. Delineamento experimental:

Animais de experimentação

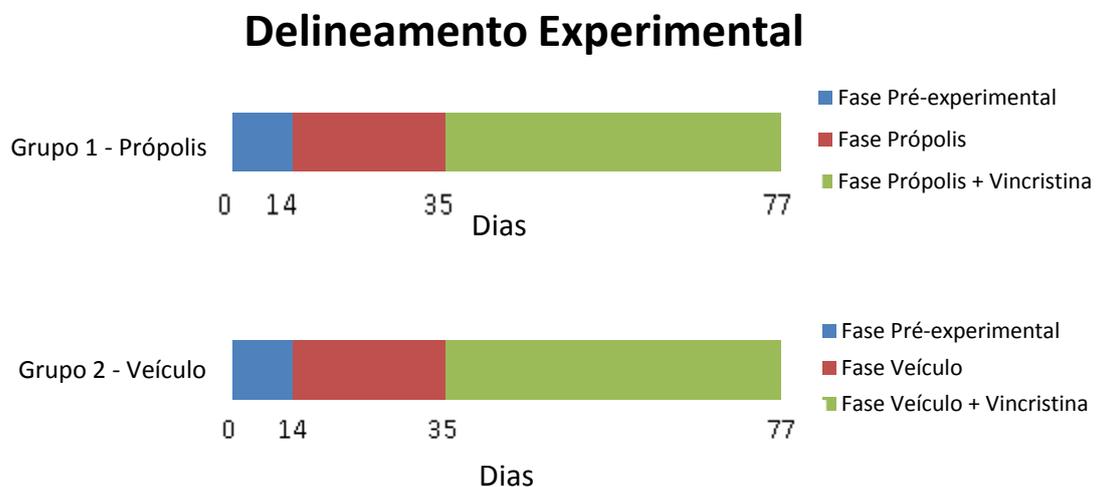
Este projeto foi devidamente submetido à Comissão de ética em experimentação animal da UESC (CEUA/UESC), sendo aprovado sob o protocolo 22/11. Os proprietários dos animais que compuseram este estudo assinaram um termo de ciência e autorização, consentindo sobre esta participação.

A amostragem foi composta por catorze fêmeas da espécie canina, atendidas na rotina clínica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), cujo diagnóstico do TVTc foi estabelecido mediante exame clínico e citológico.

Após seleção, todos os animais receberam ração comercial balanceada, quinze dias antes (fase pré-experimental) e durante toda a fase de experimentação. Foram medicados com vermífugo de amplo espectro, coleira carrapaticida e pulicida.

Estes animais foram distribuídos ao acaso em dois grupos experimentais, avaliados em três fases de tratamento, segundo um delineamento inteiramente casualizado (Figura 1).

Figura 1: Delineamento experimental representativo das fases de tratamento dos grupos 1 e 2.



No grupo 1, nove animais foram avaliados durante 77 dias, da seguinte maneira: de 0 a 14 dias os animais passaram por um período pré-experimental em que receberam apenas ração comercial balanceada, com o intuito de equalizar os animais para o período experimental; de 14 a 35 dias os animais receberam um tratamento com gel de própolis 1%, duas vezes ao dia, por via tópica, de forma a cobrir toda a lesão neoplásica; e de 35 a 77 dias os animais receberam o tratamento com gel de própolis 1% + sulfato de vincristina.

No grupo dois, cinco animais também foram avaliados durante 77 dias da seguinte maneira: de 0 a 14 dias os animais passaram por um período pré-experimental em que receberam apenas ração comercial balanceada; de 14 a 35 dias os animais receberam um tratamento com gel base aristoflex 2,5% (veículo), duas vezes ao dia, por via tópica, de forma a cobrir toda a lesão neoplásica; e de 35 a 77 dias os animais receberam o tratamento com veículo + sulfato de vincristina.

A administração do quimioterápico sulfato de vincristina foi realizada como uma infusão lenta, através da veia cefálica, na dose de 0,5mg/m² de peso corporal, por via intravenosa (IV), respeitando os critérios de biossegurança que incluem a utilização de máscaras e luvas apropriadas para o procedimento. As administrações foram realizadas semanalmente, até a remissão total do tumor ou no máximo até sete semanas, sendo necessário mais uma sessão de quimioterapia após a negatividade da citologia para células neoplásicas. E para aqueles cães que apresentaram indícios de toxicidade, por exame clínico e/ou hematológico, a administração foi realizada quinzenalmente.

c. Parâmetros avaliados

Realizou-se avaliação clínica semanal de cada animal e da neoplasia, sendo considerado o aspecto macroscópico, tipo de secreção, consistência, áreas de necrose, superfície; mensuração do perímetro - altura x comprimento (cm) da neoplasia, aferidos com o auxílio de um paquímetro.

As coletas de sangue foram realizadas semanalmente, pela veia jugular, e o material encaminhado para a realização de exames hematológicos completos, considerando a série vermelha (hemácias, hematócrito) série branca (leucócitos

totais), contagem de plaquetas, avaliação bioquímica por dosagem sérica, hepática: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e renal: uréia e creatinina, com o objetivo de avaliar a segurança do protocolo terapêutico (própolis e sulfato de vincristina) proposto no estudo.

Para o diagnóstico da neoplasia, e durante todo o período experimental, foram efetuadas citologias esfoliativas da massa tumoral vaginal, sendo as células colhidas com o auxílio de um swab, que depois foi rotacionado em lâminas de vidro para microscopia, proporcionando a transferência do material colhido. Estas foram fixadas em álcool 70^oG e coradas, mediante kit panótico rápido. A leitura das lâminas foi realizada com auxílio de microscópio óptico, objetiva de 40x, sendo contadas 200 células aleatoriamente, e classificadas como células de TVTc, células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos), células epiteliais, e estimativa de figuras de mitose e corpos apoptóticos. Além desta avaliação, também se procedeu com a classificação do padrão morfológico das células do TVTc, como sendo plasmocítico, linfocítico ou misto, segundo critérios definidos por Amaral et al. (2004).

A resposta dos indivíduos à terapia foi avaliada, tanto no que se refere aos efeitos da terapia sobre o tumor quanto aos possíveis efeitos colaterais observados (toxicidade).

Exames ultrassonográficos por varredura abdominal foram realizados para a avaliação geral dos órgãos abdominais, como fígado, rins e trato reprodutivo com o intuito de estadiar lesões que pudessem sugerir metástase nos órgãos ou linfonodos, e assegurar que nenhuma cadela gestante participasse do estudo, uma vez que o tratamento não é recomendado nessa condição por ser abortivo.

d. Análise Estatística

Para as variáveis qualitativas como a análise citológica, utilizou-se o teste de qui-quadrado em uma tabela de contingência com I linhas e J colunas para verificar se as frequências observadas em cada variável foram dependentes do tipo de tratamento utilizado. Quando alguma tabela apresentou uma frequência menor ou igual a 5, utilizou-se a simulação Monte Carlo com 10000 repetições para o cálculo da estatística de qui-quadrado. Nos casos em que o teste foi significativo, foi feito

uma análise multivariada utilizando a técnica de análise de correspondência para melhor compreender os resultados.

Para as variáveis quantitativas como hemácias, hematócrito, plaquetas, ureia, creatinina, ALT, AST e perímetro tumoral efetuou-se uma análise de variância (ANAVA) com o intuito de verificar diferenças entre os tratamentos avaliados.

Na ANAVA, utilizou-se o modelo linear misto, considerando como efeito fixo os tratamentos e como de efeito aleatório os animais. Como foram tomadas medidas em um mesmo animal durante o experimento, caracterizando um experimento de medidas repetidas, foi utilizado uma estrutura de correlação do tipo auto-regressiva de ordem 1 no modelo. Foi utilizado a função "lme" do pacote "nlme" com a opção "correlation=corAR1()" para as análises. Quando detectado diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizada a função "glht" do pacote "multcomp". Para a variável leucócitos foi feito uma análise de regressão segmentada dentro de cada grupo, e entre os grupos foi utilizado uma ANAVA como descrito para as variáveis citadas anteriormente. Tanto no grupo 1 quanto no grupo 2, foi utilizado o método da regressão segmentada.

Os gráficos foram elaborados com o auxílio dos pacotes "stats" e "ggplot2".

As tabelas foram elaboradas com o auxílio da função "latex" do pacote "Hmisc".

Todas as análises foram feitas com o auxílio do software R Core Team (2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Parâmetros clínicos

Todas as cadelas que compuseram este estudo não possuíam raça definida (SRD), corroborando com Silva et al. (2007) e Bassani-Silva (2008) que encontraram o predomínio de animais SRD em seus estudos. Embora tenha sido observada a associação do TVTc com animais SRD, provavelmente este resultado não se

relaciona diretamente com a raça dos animais, e sim com as questões de criação e manejo, uma vez que todas as cadelas possuíam livre acesso à rua ou eram submetidas a reprodução de forma indiscriminada.

Durante a fase pré-experimental do estudo, observou-se que as cadelas selecionadas apresentavam índice corpóreo abaixo do ideal, presença de endo e ectoparasitas, sendo necessária a administração de vermífugo de amplo espectro, carrapaticida e pulicida, além de uma ração comercial balanceada. Estes procedimentos possibilitaram que as cadelas obtivessem ganho de peso necessário e resposta fisiológica satisfatória para a inclusão das mesmas nas fases seguintes de tratamento.

A variação de idade foi de 2 a 7 anos, semelhante ao citado por Sousa et al. (2000), Bassani-Silva (2008) que relacionam a maior ocorrência nesta faixa etária, com o período de maior atividade sexual.

No histórico sobre o curso da doença, os relatos foram de que o tempo de aparecimento dos sinais clínicos variou de menos de 1 mês a mais de 10 meses, sendo o sangramento o primeiro sinal clínico a ser relatado.

Quanto à localização do tumor, houve maior ocorrência no assoalho vaginal, não sendo observado nenhum quadro de metástase nos animais. Os órgãos genitais são os mais acometidos pelo TVTc devido à transmissão ser normalmente pela cruza (SILVA et al., 2007) As metástases são incomuns e usualmente ocorrem em animais que encontram-se em condições fisiológicas debilitantes, como na imunossupressão, desnutrição e em cães jovens (DAS; DAS, 2000; PARK et al., 2006).

O aspecto macroscópico das lesões teve uma variação do tipo couve-flor (57,14%), peduncular (35,71%) e papilar (7,14%), no período pré-experimental (Figura 2). Essas lesões foram semelhantes às citadas por Bassani-Silva (2008).

Figura 2: Apresentação clínica das formas genitais do tumor venéreo transmissível canino - TVTc: couve-flor (a), peduncular (b), papilar (c).



Quanto ao tipo de secreção, observou-se que na fase pré-experimental, em ambos os grupos, houve o predomínio de secreções sanguinolenta e serosanguinolenta. E à medida que se introduziu o tratamento com vincristina aos grupos, houve alteração da secreção para o tipo serosa ou ausência de secreção.

Em relação à resposta dos animais aos tratamentos, em uma cadela pertencente ao grupo 1, na fase em que foi tratada apenas com própolis em gel, visualizou-se regressão macroscópica evidente durante a instituição desta terapia, sendo que na sexta semana houve também ausência de células de TVTc ao exame citológico, permanecendo assim durante as 3 semanas seguintes. Dessa forma, esta cadela não foi submetida ao tratamento de associação da própolis com o quimioterápico sulfato de vincristina, sendo excluída da análise estatística.

Para aqueles animais tratados com vincristina, a média de administrações deste quimioterápico nos animais do grupo 1 foi de 4,62 ($\pm 1,06$) e no grupo 2 foi de 5 ($\pm 0,71$), não havendo diferença significativa entre estes.

Embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos, pôde-se observar que no tratamento com a própolis em gel houve uma diminuição do perímetro tumoral, enquanto que com o uso do veículo, o perímetro tumoral continuou aumentando, havendo regressão apenas após a instituição da quimioterapia com vincristina (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias e desvios padrão da variável perímetro tumoral (cm) dos tratamentos referentes ao Grupo 1 e 2 respectivamente.

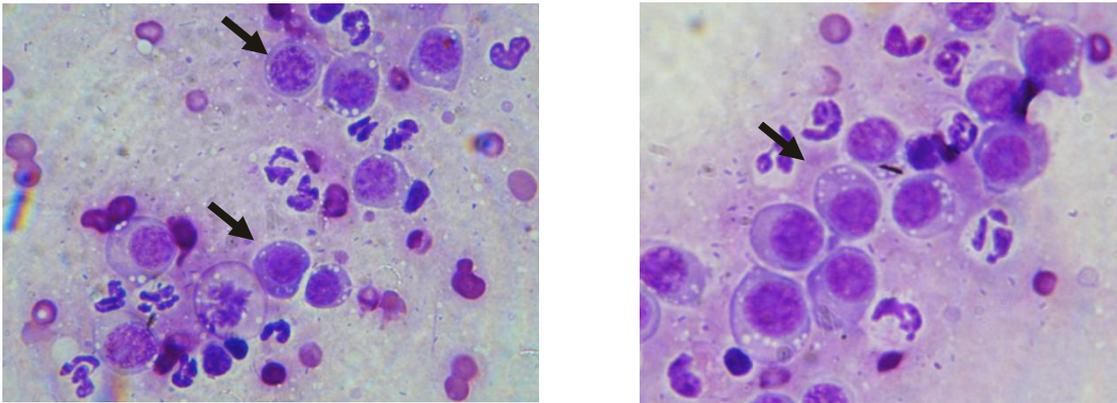
Grupo1	Perímetro	
	Média	Desvio
Pré-própolis	24,58	16,02
Própolis	20,65	17,80
Grupo 2	Perímetro	
	Média	Desvio
Pré-veículo	19,78	19,77
Veículo	27,56	16,06

4. 3.2 Parâmetro citológico

O exame citológico foi eficiente para firmar o diagnóstico do TVTc e para proceder com a classificação quanto ao padrão morfológico predominante.

Considerando o primeiro exame citológico realizado nos animais, o padrão morfológico mais frequente foi o plasmocitóide (57,14%), seguido pelo misto (42,85%). O tipo linfocitóide foi observado neste momento (Figura 3). Entretanto, a realização dos exames semanais, de forma seriada, permitiu verificar que em 85,71% dos animais houve variação do padrão morfológico, considerando-se o mesmo indivíduo. Estes resultados diferem daqueles encontrados por Amaral et al. (2007) que sugerem que o padrão morfológico pode ser utilizado como fator prognóstico para o TVTc, e que o padrão plasmocitóide está relacionado a um comportamento biológico mais agressivo, e possui maior capacidade de se desenvolver em locais extragenitais e de metastatizar.

Figura 3 – Exames citológicos de TVTc, evidenciando dois tipos de padrões morfológicos celulares: (a) linfocitóide – predominância de células redondas, com citoplasma escasso, maior relação núcleo/citoplasma, com presença de vacúolo citoplasmático e (b) plasmocitóide – predominância de células ovoides, citoplasma amplo e núcleo excêntrico, com presença de vacúolo citoplasmático (Coloração panótico, objetiva 100x).



A relação entre vacuolização citoplasmática e fase tumoral evidenciou que em 81,25% das citologias, a alta vacuolização estava presente quando havia um maior número de células de TVT (contagem entre 100 e 190 células). Após a instituição do quimioterápico, houve redução tanto da frequência das células do TVTc quanto dos vacúolos citoplasmáticos destas células. Esse resultado divergiu do encontrado por Nak et al. (2005) que relataram aumento do número de vacúolos nas células do TVTc, nos animais tratados com sulfato de vincristina.

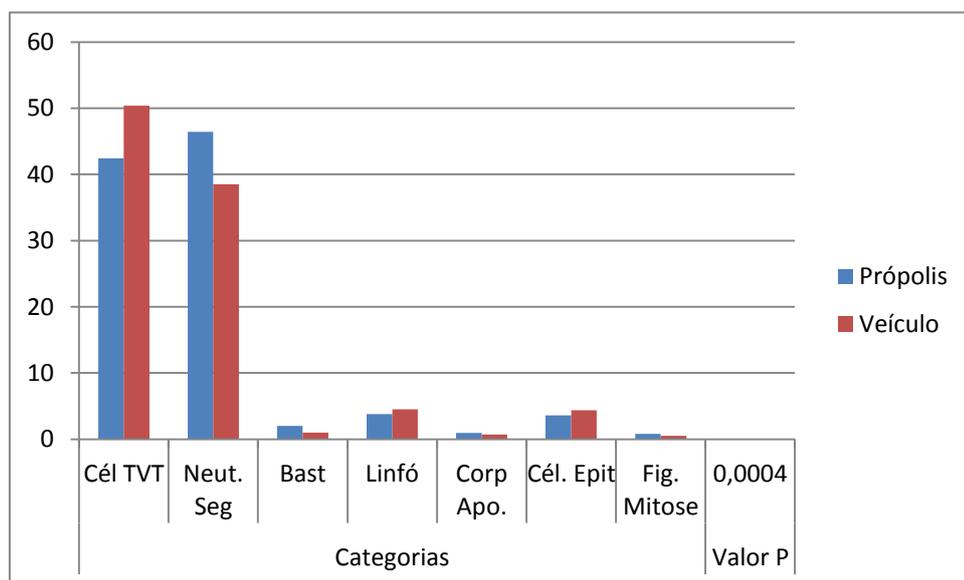
Avaliando-se a porcentagem das células de TVTc que ocorreram nas três fases dos tratamentos dos grupos 1 e 2, foi possível constatar que, nos animais do grupo 1, houve diminuição na frequência destas células, durante a fase em que os animais foram tratados com própolis, em relação à fase pré-experimental. Já no grupo 2, observou-se aumento na frequência das células do TVTc, na fase do tratamento com o veículo (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela de contingência da variável citologia referente ao grupo 1 e grupo 2. Valores em percentagem.

Categorias	Tratamentos					
	GRUPO 1			GRUPO 2		
	Pré-própolis	Própolis	Vincristina + Própolis	Pré-veículo	Veículo	Vincristina +Veículo
Célula TVT	51,89	42,14	11,1	52,07	57,89	11,86
Segmentados	38,54	46,8	37,76	40,95	34,69	42,33
Bastonetes	0,37	1,41	0,82	1,27	1,25	1,59
Linfócitos	6,25	5,24	6,12	2,79	3,4	5,16
Corp. Apopt.	0,83	1,16	24,68	0	0,62	21,58
Cél. Epitelial	1,63	2,67	18,93	2,46	1,82	16,76
Fig. de mitose	0,5	0,58	0,59	0,45	0,32	0,72

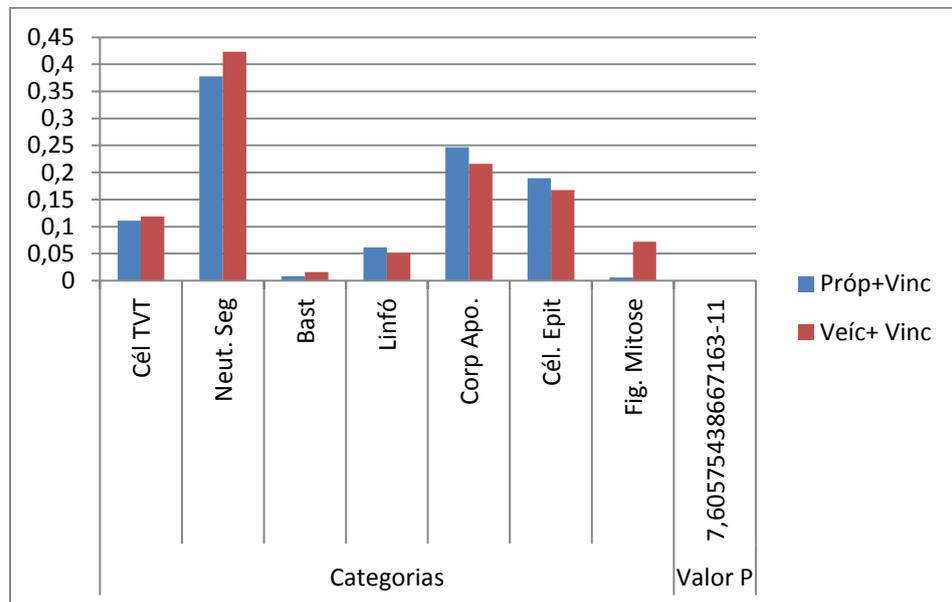
Quando comparados os exames citológicos dos tratamentos com própolis e veículo, verificou-se que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,1$) (Figura 4).

Figura 4 – Gráfico de contingência da variável citologia referente à análise própolis versus veículo. Valores em percentagem.



Na comparação dos exames citológicos entre os tratamentos própolis+vincristina e veículo+vincristina, também observou que havia diferença significativa entre os grupos ($p < 0,1$) (Figura 5).

Figura 5 – Gráfico de contingência da variável citologia referentes a análise própolis+vincristina versus veículo+vincristina. Valores em percentagem.



O comportamento celular de diminuição no número de células de TVTc com o uso da própolis em gel, de forma isolada ou em associação à vincristina, indica sua ação antineoplásica. Em análise da composição química da própolis verde utilizada neste estudo foram detectados compostos fenólicos (mg/g), sendo identificada a presença de Artepilin C em níveis elevados (87,97mg/g).

Kimoto et al. (1998) relataram o efeito citotóxico *in vitro* e a inibição do crescimento das células tumorais *in vivo*, após uso do artepilin C, extraído de uma amostra de própolis brasileira. A fragmentação do DNA, e a conseqüentemente a indução da apoptose pelo artepilin C, foi apontada como mecanismo de ação proposto para estas atividades.

A atividade antiangiogênica *in vivo* também foi demonstrada com a administração oral (13-50mg/ml) do artepilin C oriundo de extrato de própolis brasileira, reduzindo significativamente o número de vasos neoformados induzido pelo sarcoma de células S180 em camundongos (AHN et al., 2007).

Bassani-silva et al. (2007) relataram efeito antitumoral *in vitro* de extrato de própolis brasileira, e de seus compostos isolados, sobre culturas celulares de TVTc, numa concentração de 100µl, após 6 horas de tratamento.

Em relação ao infiltrado inflamatório; os neutrófilos segmentados, bastões e linfócitos diferiram significativamente ($p < 0,1$) entre os grupos, em que o aumento na

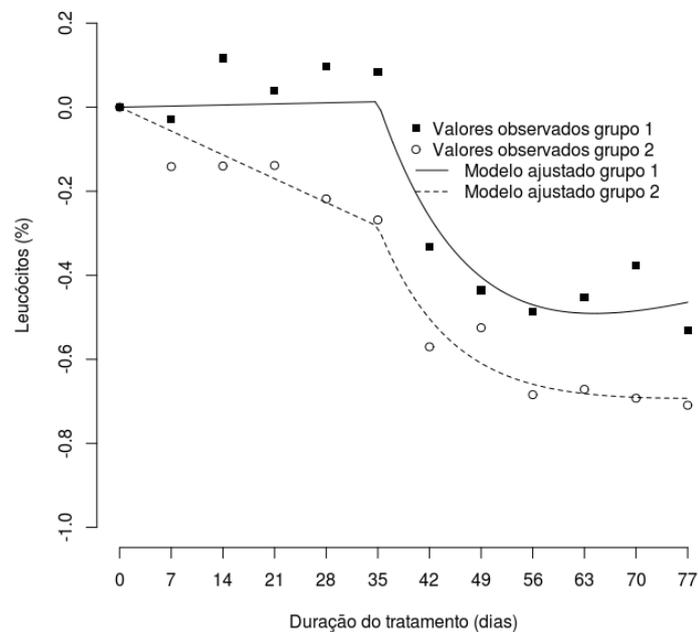
quantidade de linfócitos no tratamento própolis+vincristina demonstrou uma resposta imunológica celular, no tratamento com a própolis em gel (Figura 5). Esses achados corroboram com GONZALES et al. (2000) que observaram na fase de regressão do tumor uma redução da proliferação das células neoplásicas, e um aumento no número de linfócitos. Esse comportamento revela um possível efeito imunomodulatório ocasionado pela própolis, que faz com que haja um aumento na resposta imune humoral, tornando-a aplicável no combate de processos indesejáveis como neoplasias (FISHER, 2008).

4.3.3 Parâmetros Hematológicos

Em relação à contagem de leucócitos totais, 61,6% dos animais que participaram deste estudo possuíam leucocitose (valores acima de $17 \times 10^3/\mu\text{L}$), no período pré-experimental. Este comportamento pode estar associado com uma síndrome paraneoplásica, uma vez que quadros de leucocitose neutrofílica tem sido relatada em cães com linfoma, carcinoma renal e fibrossarcoma metastático (BERGMAN, 2007). Também deve-se considerar a possibilidade do estímulo por doenças concomitantes, o que é menos provável dada a alta incidência nos animais.

Durante a fase de tratamento com própolis ou veículo, observou-se que nos animais do grupo 1 a contagem de leucócitos permaneceu estável, enquanto que nos animais do grupo 2 houve uma diminuição da contagem dos leucócitos. Quando os animais foram submetidos ao tratamento com o quimioterápico sulfato de vincristina, ocorreu diminuição desta contagem, em ambos os grupos. Realizou-se uma análise de regressão que revelou que a redução da contagem de leucócitos totais, foi significativamente menor ($p < 0,1$) nos animais do grupo 1 quando comparados ao grupo 2, em relação à fase pré-experimental (Figura 6).

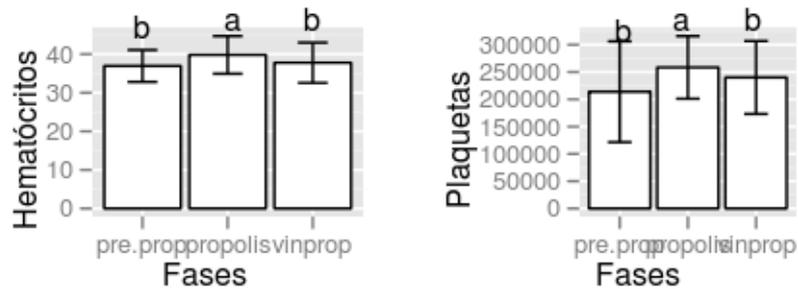
Figura 6 - Leucócitos com valores em porcentagem em relação ao período pré-experimental referentes aos grupos 1 e 2.



A diminuição na contagem de leucócitos totais após a instituição da terapia com sulfato de vincristina também foi observada em estudos realizados por Sobreira et al. (2004) e Faro et al. (2008). Esta redução relaciona-se aos efeitos tóxicos desta substância que promove uma supressão reversível da atividade granulopoiética. Neste estudo, a associação da própolis+vincristina minimizou o efeito tóxico da vincristina sobre os leucócitos. Em estudos realizados por Oršolić e Bašić (2005a) verificou-se aumento do número de leucócitos no sangue periférico após a administração oral (50mg/kg) de um derivado hidrossolúvel da própolis (WSDP), em ratos com carcinoma transplantável mamário. Realizou-se associação do WSDP ao quimioterápico Epirrubicina, sendo verificada manutenção dos parâmetros hematológicos em normalidade, diferente dos animais tratados apenas com o quimioterápico.

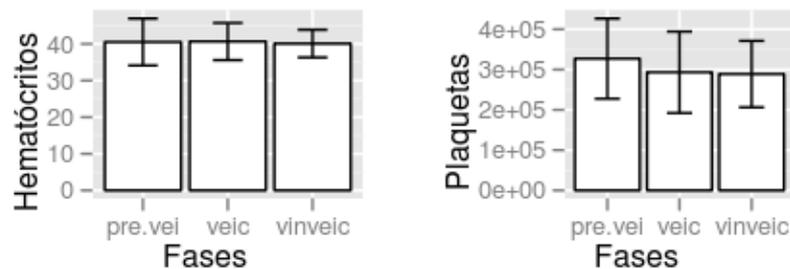
Em relação aos parâmetros hematócrito e plaquetas, houve um aumento significativo ($P < 0,10$) destes parâmetros nos animais tratados com própolis, em relação à fase pré-experimental, sendo observado aumento de 7,74% e 20,82%, respectivamente (Figura 7). Já no grupo 2, não houve alteração significativa dos mesmos parâmetros (Figura 8).

Figura 7: Análise comparativa do Grupo 1 quanto os parâmetros hematócrito e plaquetas.



*a /b Letras minúsculas distintas diferem significativamente ($p < 0,1$) pelo teste Z.

Figura 8: Análise comparativa do Grupo 2 quanto os parâmetros hematócrito e plaquetas.



Após a instituição da terapia com sulfato de vincristina, foi observado um decréscimo nos valores de hematócrito e plaquetas, em ambos os grupos, refletindo o efeito tóxico da vincristina.

Devido à redução nos valores plaquetários após o início da quimioterapia, abaixo do valor de referência, fez-se necessária alterar a aplicação da vincristina para intervalo quinzenal, em dois animais, ao invés de semanal como era realizado usualmente. O resultado encontrado se assemelha ao de Sobreira et al. (2004), que evidencia a vincristina como indutora na diminuição tanto de plaquetas como de megacariócitos. E sugere que a trombocitopenia induzida pela vincristina pode ser ocasionada por dois processos, pela toxicidade direta nas plaquetas circulantes, diminuindo seu tempo de sobrevivência, e por diminuição da produção de plaquetas.

A administração da vincristina também induziu a diminuição do número de hemácias, em ambos os grupos, promovendo quadros de anemia em 30,76% dos animais (considerando valores inferiores a 5.400.000 hemácias). Essa observação

foi semelhante ao encontrado por Sobreira et al. (2004) em que a análise sobre a ação hematotóxica da vincristina revelou que a dosagem de 0,025 mg/kg induziu a diminuição da proliferação celular da linhagem eritróide, e Faro et al. (2008) cujo trabalho encontrou alterações significativas, com diminuição constante do número de hemácias. No entanto resultados diferentes foram encontrados em um estudo que realizou aplicações semanais que variaram de 0,5 a 1,0 mg/m² durante 6 semanas e não constatou nenhum quadro de hematotoxicidade nos 35 animais tratados (SOUZA et al., 2000).

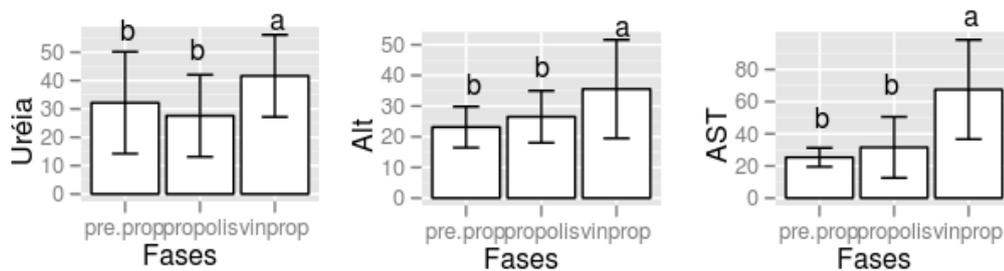
4.3.4 Alterações Ultrassonográficas e Parâmetros Bioquímicos

Mediante o exame ultrassonográfico foi possível constatar 92,85% dos animais deste experimento apresentavam alterações hepáticas, renais e/ou esplênicas no período pré-experimental, sendo que 42,85% apresentavam nefropatias, 71,42% hepatopatias e 57,14% esplenopatias. Este resultado demonstra a necessidade de que seja investigada uma possível relação entre o TVTc genital e as alterações nestes órgãos. Além disto, recomenda-se especial atenção quando da administração do sulfato de vincristina, uma vez que este quimioterápico possui metabolização hepática (CHUN et al., 2007)

Neste sentido, a medida que se iniciou o tratamento com a vincristina, em ambos os grupos, a frequência de animais com acometimento hepático aumentou, evidenciando um quadro de hepatotoxicidade. Além do fígado, também foi constatado aumento na frequência de alterações esplênicas, após o início da quimioterapia. A utilização da própolis, de forma isolada ou em associação à vincristina, não influenciou na frequência das alterações ultrassonográficas.

Quanto à avaliação das enzimas bioquímicas Uréia, ALT e AST observaram-se aumento significativo ($P < 0,10$) dos valores destas, após o início do tratamento com vincristina, sendo este mais um indício de toxicidade deste quimioterápico. O tratamento com própolis em gel não acarretou em alterações nos valores destas, em relação ao período pré-experimental (Figura 9).

Figura 9: Análise comparativa do Grupo 1 quanto os parâmetros Uréia, ALT e AST.



*a /b Letras minúsculas distintas diferem significativamente ($p < 0,1$) pelo teste Z.

Simermann (2009) constatou aumento nos níveis de ALT e de creatinina em cães com TVTc, que receberam 0,03 mg/kg de sulfato de vincristina, durante 6 semanas. De forma contraditória, em um estudo realizado por Huppes (2011) as avaliações de ALT, AST e creatinina mantiveram-se dentro do padrão de normalidade para a espécie, após a administração de vincristina a 0,75mg/m²

No presente estudo, não foi observada alteração significativa dos valores da creatinina sérica, ao passo que as enzimas AST e Uréia foram aquelas que sofreram maior alteração em decorrência da administração do sulfato de vincristina.

Esses resultados demonstram a importância da realização de exames complementares, como hemograma, exames bioquímicos e ultrassonografia, para monitoramento de alterações decorrentes da quimioterapia com sulfato de vincristina em animais com TVTc.

Essas enzimas que obtiveram diferenças significativas entre as fases avaliadas, apresentaram uma progressão linear a partir da introdução do tratamento com a vincristina. Isso reflete o grau de toxicidade que o uso da quimioterapia para o tratamento de neoplasias pode causar ao indivíduo.

O sulfato de vincristina resultou em regressão tumoral de 100% dos casos, mas os efeitos tóxicos puderam ser observados por meio da diminuição do número de leucócitos totais, plaquetas e hematócrito, e alterações nas enzimas AST, ALT e ureia.

5. CONCLUSÕES

Mediante este trabalho verificou-se que o modelo do TVTc é viável para a avaliação de terapias antineoplásicas *in vivo*. A formulação tópica da própolis apresentou efeito antineoplásico, de forma isolada e em associação ao quimioterápico sulfato de vincristina, acarretando em diminuição da celularidade de TVTc em exames citológicos. O sulfato de vincristina apresentou eficácia em 100% dos casos, porém foram evidenciados como sinais de toxicidade, diminuição na quantidade de leucócitos totais, plaquetas e hematócrito. A associação do tratamento própolis+vincristina foi eficiente em minimizar a toxicidade sobre os leucócitos. Foram constatadas alterações nas enzimas AST, ALT e Uréia, e alterações ultrassonográficas compatíveis com hepatotoxicidade após a administração do sulfato de vincristina. A associação com a própolis não influenciou nestes parâmetros.

6. REFERÊNCIAS

AHN, M.-R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepilin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.

AMARAL, A.S. et al. Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, p. 167-171, 2004.

AMARAL, A. S. et al. Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. **Revista Portuguesa, Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 563-564, 2007.

AMOROS, M. et al. *In vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.

BANKOVA, V.S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246, 2000.

BASSANI-SILVA, S. et al. Propolis effect *in vitro* on canine Transmissible Venereal Tumor cells, **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 261-265, 2007.

BASSANI-SILVA, S. “Imunoexpressão e citogenética do Tumor Venéreo Transmissível natural no cão”. **Tese** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, 2008.

BERGMAN, P. J. Paraneoplastic Syndromes. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders. p.785-823, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2001.

BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, p. 1523-1527, 2009.

CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CHIKARAISHI, Y. et al. Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. **Mol Nutrition Food Reserch**, v.4, p 566-75, 2010.

CHUN, R. et al. Cancer Chemotherapy. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders. p.785-823, 2007.

DAS, U.; DAS, A. K. Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 8, p. 545-556, 2000.

ETTLIN, R. A.; PRENTICE, D. E. Unexpected tumour findings in lifetime rodent bioassay studies--what to do? **Toxicology Letters**, v. 128, n. 1-3, p. 17-33, 2002.

FARO, A. M et al., Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo Experimental. **Ars veterinária**, v.24, n.1, p.01-08, 2008.

FASSATI, A.; MITCHISON, N.A. Testing the theory of immune selection in cancers that break the rules of transplanted. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 59, p. 643-651, 2010.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela Própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

GONZALEZ, C. M. et al. 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, n. 4, p. 241-248, 2000.

HSIAO, Y.-W. et al. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 1–2, p. 19-27, 2002.

HUPPES, R. R. “Avaliação da resposta citotóxica no tratamento do Tumor Venéreo Transmissível em cães através da utilização de Bleomicina ou Vincristina”. **Dissertação** - Universidade de Franca, 2011.

KIMOTO T, et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection Prevention Journal**, v.6, p.506-515, 1998.

LIAO, K.-W. et al. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 3–4, p. 149-162, 2003.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.388-395, 2007.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MARCHAL, T. et al. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1–2, p. 1-11, 1997.

MARCUCCI, M. C, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n.5, p. 529-536, 1996.

MENEZES, H. et al. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v.28, p.71-76, 1997.

MISSIMA, F. et al. The effect of propolis on proinflammatory cytokines produced by melanoma bearing mice submitted to chronic stress. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v.1, p.11–15, 2009.

MURGIA, C. et al. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 477-487, 2006.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 452-456, 2007.

NAK, D. et al. A Clinico-pathological Study on the Effect of Vincristine on Transmissible Venereal Tumour in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 7, p. 366-370, 2005.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005a.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 37-45, 2005b.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; EROĞLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, n. 10, p. 742-747, 2005.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K. et al. Classificação das própolis Brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, n.58, 2000.

PARK, M. S. et al. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 130-133, 2006.

PÉREZ, J.; J. DAY, M.; MOZOS, E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 133-147, 1998.

POPOVA, M. et al. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin* **Apidologie**, v. 38, p.306– 311, 2007.

SANTOS, F. G. A. et al. Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidência bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 557-562, 2001.

SANTOS, F. G. A. et al. O tumor venéreo transmissível canino – Aspectos gerais e abordagens moleculares (Revisão de Literatura). **Bioscience Journal**, v. 21, p.41-53, 2005.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.1-14, 2007.

SHARKEY, L. C.; WELLMAN, M. L. Diagnostic Cytology in Veterinary Medicine: A Comparative and Evidence-Based Approach. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2011.

SILVA, M.C.V. et al. Avaliação epidemiológica, diagnóstica e terapêutica do tumor venéreo transmissível (TVT) na população canina atendida no hospital veterinário da UFERSA. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, p.28-32, 2007.

SIMERMANN, N. F. S. “Sulfato de vincristina no tratamento do Tumor Venéreo Transmissível frente à caracterização citomorfológica”. **Dissertação** - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009.

SOBREIRA, M. R.F et al., Ação hematotóxica do sulfato de vincristina sobre a celularidade sangüínea central e periférica em cães. **Ars veterinária**, v. 20, p. 169-174, 2004.

SOSA, S. et al. Topical Antiinflammatory Activity of an Innovative Aqueous Formulation of Actichelated® Propolis vs Two Commercial Propolis Formulations. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 823–826, 2007.

SOUSA, J. et al. 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.

SPUGNINI, E. P. et al. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine genital tumor model of chemoresistance: Sticker sarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 27, p. 1-5, 2008.

STEPHEN, J. W. et al. Miscellaneous Tumors. In: **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fourth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders. p.785-823, 2007.

TEIXEIRA, E. W. et al. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **B. Indústria animal**, v.60, p.83-106, 2003

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 86-92, 2011.