

Sandra Bassani Silva

Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor  
venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro*.

BOTUCATU - SP

Janeiro - 2005

Sandra Bassani Silva

Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor  
venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro*.

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adjunta Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

BOTUCATU - SP

Janeiro - 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Bassani-Silva, Sandra.

Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro*. / Sandra Bassani-Silva. - 2005.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Adjunta Noeme Sousa Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

Assunto CAPES: 40101134

1. Tumores em animais. 2. Tumores – Cão – Estudos experimentais.
3. Própolis – efeito antitumoral.

CDD 636.70896992

Palavras chave: AgNOR; CEC; Cães; Cultura celular; Própolis; Tumor venéreo transmissível.

A vocês, meus pais, que são responsáveis por tudo o que sou e por tudo que eu conquistei até hoje. A vocês que se doaram por inteiro, que abdicaram de muitos de seus sonhos para que os meus se tornassem realidade, eu dedico este trabalho e todas as minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Noeme Sousa Rocha, pela orientação, por todos os conhecimentos transmitidos, pela confiança e amizade. Minha admiração pela sua paixão à pesquisa e ao trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor José Maurício Sforcin, pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, pela confiança, pela paciência nas correções e pelos agradáveis momentos de convívio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo nº 02/09617-6) e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP - Processo nº 0772/02-DFP) pelo auxílio financeiro.

À Daisy Maria Fávero Salvadori e ao Daniel Araki Ribeiro, não só por terem dado as primeiras explicações de como realizar uma cultura, mas principalmente pelo carinho e pela amizade com que me recebem.

Ao Professor Ramon Kaneno por ter auxiliado nos nossos primeiros passos na cultura celular e pela prontidão em tirar dúvidas.

Ao Osimar de Carvalho Sanches, por ter sido o responsável pela minha paixão pela Patologia (Oncologia), pelo grande apoio e pelas primeiras aulas de como fazer uma coloração de AgNOR.

Ao Luis Fernando Barbisan, por ter ensinado os primeiros passos na coloração de CEC.

À Professora Maria Luiza Silveira Mello e ao Professor Benedicto de Campos Vidal por terem prontamente passado seus conhecimentos nas colorações de AgNOR e CEC e por terem aberto as portas de seu laboratório no Departamento de Biologia Celular da UNICAMP para que retirássemos dúvidas.

À Professora Maria Luiza Countrim S. Oliveira, pela atenção e paciência em checar a coloração das lâminas de AgNOR.

Ao Luís e à dona Lourdes (técnicos do Departamento de Imunologia do IB), por deixarem sempre prontos os materiais necessários para a realização das culturas.

Ao Professor Júlio Lopes Sequeira e à Professora Teresa Cristina G. O. Sequeira, pelos conselhos oferecidos nesses anos e pelas agradáveis tardes em sua casa.

À Professora Renée Laufer Amorim, pela paciência em dividir sua sala para que eu pudesse utilizar o analisador e, principalmente, pelas palavras de carinho nas horas de maior aflição.

À Equipe TVT-linfoma (Adriana Wanderley de Pinho Pessoa, Anne Santos do Amaral e Luiz Fernando Jantzen Gaspar), não só pelo apoio técnico, mas por terem tornado meus dias de trabalho mais agradáveis!

Aos Residentes da Patologia (Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, Leandro Bertoni Cavalcanti Teixeira e Arlete Benta de Souza), por chamarem nos casos de TVT e pelo convívio descontraído.

Aos Residentes da Cirurgia (Ricardo e Taís), por auxiliarem na coleta das biópsias.

Ao Professor José Celso Soares Vieira, pela revisão e correção da Língua Portuguesa.

Ao Fábio Henrique Evangelista de Andrade, pela formatação desta dissertação e pelo capricho na escolha dos detalhes.

A todos os professores, funcionários e colegas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e a todos do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências - UNESP, pelo carinho e convivência agradável, conseguindo transformar o local de trabalho em um ambiente prazeroso.

A todas as pessoas que foram importantes para mim, pois para que eu chegasse até aqui, foram necessários não só o apoio técnico e profissional, mas sim o apoio das pessoas que, mesmo por alguns segundos, passaram pela minha vida e que contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento!!

"Grandes realizações são  
possíveis quando se dá  
importância aos pequenos  
começos".

(Lao-Tsé)

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
EPÍGRAFE.....	vii
SUMÁRIO .....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO .....	xv
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	23
2.1. Tumor venéreo transmissível.....	24
2.1.1. Incidência, sexo, raça, idade e forma de transmissão .....	24
2.1.2. Imunologia .....	25
2.1.3. Diagnóstico citopatológico .....	27
2.1.4. Marcadores de proliferação celular .....	28
2.1.4.1. Regiões organizadoras de nucléolos argotófilicas (AgNOR).....	29
2.1.4.2. Concentração eletrolítica crítica (CEC).....	30
2.1.5. Terapia .....	32
2.2. Própolis e o sistema <i>in vitro</i> .....	32
2.2.1. Própolis.....	32
2.2.2. Sistema <i>in vitro</i> .....	36
3. OBJETIVOS .....	38
3.1. Geral .....	39
3.2. Específicos .....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
4.1. Câmara de ética em pesquisa.....	41
4.2. Seleção do TVT natural .....	41
4.3. Exame citopatológico.....	42
4.3.1. Punção - CAAF - TVT superficial .....	42
4.3.2. Esfoliação - escova ginecológica - TVT profundo.....	43
4.3.3. Processamento das amostras .....	43
4.3.4. Leitura e classificação das amostras citológicas - Giemsa....	44
4.4. Marcadores de proliferação celular para avaliar a agressividade dos diferentes grupos morfológicos .....	45



4.4.1. Regiões organizadoras nucleolares argentofílicas (AgNOR)	45
4.4.1.1. Leitura das amostras citológicas - AgNOR .....	46
4.4.2. Concentração eletrolítica crítica (CEC) .....	47
4.4.2.1. Leitura das amostras citológicas - CEC.....	47
4.5. Própolis e o sistema <i>in vitro</i> .....	48
4.5.1. Própolis .....	48
4.5.2. Cultura celular (sistema <i>in vitro</i> ) .....	49
4.6. Análise estatística.....	50
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1. Observações gerais.....	53
5.2. Manifestação clínica do tumor .....	53
5.3. Padronização morfológica do TVT .....	57
5.4. Marcadores do índice de proliferação celular .....	60
5.4.1. AgNOR .....	60
5.4.2. CEC .....	65
5.5. Cultura celular e própolis.....	70
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Distribuição dos cães que participaram do estudo de acordo com a manifestação clínica: faixa etária, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico do TVT forma natural. ....	55
TABELA 2 -	Distribuição das neoplasias nos Grupos Linfocitóide, Plasmocitóide e Misto e sua correlação à faixa etária, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico do TVT forma natural.....	60
TABELA 3 -	Freqüência de amostras de acordo com a manifestação clínica (idade, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico) nos grupos morfológicos, no índice de proliferação celular pelo AgNOR. ....	61
TABELA 4 -	Distribuição das medidas do índice de proliferação celular pelo AgNOR nos Grupos Linfocitóide, Misto e Plasmocitóide do TVT, forma natural. ....	63
TABELA 5 -	Distribuição dos valores médios do índice de proliferação celular pelo AgNOR e sua correlação com o comportamento biológico, primário e não-primário, no TVT na forma natural. ....	64
TABELA 6 -	Distribuição da mediana do índice de proliferação celular pelo AgNOR e sua correlação com a localização, genital e extragenital, no TVT na forma natural .....	65
TABELA 7 -	Freqüência de amostras de acordo com a manifestação clínica (idade, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico) nos grupos morfológicos, no índice de proliferação celular pelo CEC. ....	67
TABELA 8 -	Distribuição dos valores médios do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com os Grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto no TVT na forma natural.....	68
TABELA 9 -	Distribuição das medianas do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com o comportamento biológico, primário e não-primário, no TVT na forma natural.....	69
TABELA 10 -	Distribuição das medianas do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com	

a localização, genital e extragenital no TVT forma natural. ....	70
TABELA 11 - Viabilidade celular (%) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação, com diferentes concentrações de própolis.....	71
TABELA 12 - Concentração celular ( $\times 10^6$ céls./ml) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação com diferentes concentrações de própolis .....	72

BASSANI-SILVA, S. Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível canino: ensaios *in vitro*. 2005, 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## RESUMO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é a segunda neoplasia de maior prevalência nos cães atendidos no Hospital Veterinário de Botucatu. Na associação entre o comportamento biológico do tumor e a clínica desses animais, há fortes diferenças em relação às apresentadas na literatura especializada no assunto. O TVT desperta, no meio científico, o interesse pela sua origem, modo de transmissão e questionável regressão espontânea, fato atribuído ao comportamento versátil desse tumor, diferindo dos mecanismos de outras neoplasias. Investigações têm sugerido fenômenos semelhantes aos que ocorrem nos tumores de outras espécies, inclusive no homem. A quimioterapia para o TVT é a mais indicada. Porém, traz efeitos colaterais extremamente tóxicos às células desses animais. Pesquisadores relatam a propriedade antitumoral *in vitro* da própolis sobre o grau de agressividade do TVT. Para tal, foram utilizadas células neoplásicas de 77 animais, sem distinção por raça, sexo e idade. Os animais foram provenientes do Hospital Veterinário da FMVZ - UNESP, Campus de Botucatu. As neoplasias foram divididas em três Grupos: TVT linfocitóide; TVT plasmocitóide e TVT misto. Nestas neoplasias, o índice de proliferação celular foi verificado pelo AgNOR e CEC, para auxiliar a averiguar o grau de agressividade do tumor. No final do estudo, foi possível observar que a própolis apresenta atividade antitumoral tempo-dose dependente sobre as células de TVT, incluindo nas do grupo plasmocitóide (considerada a de maior agressividade), onde, após 48 horas e na concentração de 100 µg, a atividade antitumoral é efetiva. Concluímos também que os marcadores de proliferação (AgNOR e CEC) mostram-se eficientes para monitorar a evolução do TVT e que, a avaliação clínica, morfológica e o estudo *in vitro* auxiliam no diagnóstico, na conduta terapêutica e na monitoração do TVT.

**Palavras-chave:** AgNOR; CEC; Cães; Cultura celular; Própolis; Tumor venéreo transmissível.

BASSANI-SILVA, S. Effect of propolis on transmissible venereal canine tumor: *in vitro* studies. 2005, 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## ABSTRACT

The transmissible venereal tumor is the second most common neoplasia among the dogs attended in the Veterinary Hospital of Botucatu. When neoplastic biological behavior and clinical findings are associated, intense differences were presented with the literature. In the scientific environment, interest in the origin of this tumor, the means of transmissible and questionable spontaneous regression, since this tumour has a versatile behavior, differs from that in other neoplasias. Studies have been done that show similar phenomena occurring in human neoplasias. Chemotherapy is advised for transmissible venereal tumor, but it has extreme toxicity for other cells. Investigators have related the antitumoral properties of propolis; so, this study aimed to verify the supposed antitumoral effect on the transmissible venereal canine tumor, in order to minimize the toxicity caused by chemotherapy. Seventy-seven animals from Veterinary Hospital of Botucatu, were used. Based on the cellular morphology stained with Giemsa, new nomenclature was created and the animals were divided into three groups: "lymphocyte-like" transmissible venereal tumor, "plasmocyte-like" transmissible venereal tumor and "mixed" transmissible venereal tumor. Proliferation markers (AgNOR and CEC) were used to verify whether there were malignancies, in different morphological groups and in the sensitivity to propolis, were studied *in vitro*. In this study, we saw that propolis showed activity on transmissible venereal tumor. After 48 hours and with 100 µg of propolis, the antitumoral activity was effective, including the "plasmocyte-like" transmissible venereal tumor, that showed cytotoxic effect only with the greatest dose and the longest time.

**Key-words:** AgNOR; CEC; Dogs; Cellular culture; Propolis; Transmissible venereal tumor.

## 1. INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa, sexualmente transmissível, de origem incerta que, em condições naturais, afeta somente cães (ROGERS, 1997; TINUCCI-COSTA, 1999; MacEWEN, 2001; CATONE *et al.*, 2003). Além da localização genital, o TVT também pode ter localização extragenital, pelo hábito social de lambar ou de farejar a genitália externa permitindo a implantação de células neoplásicas e conseqüentemente o seu crescimento em sítios extragenitais (VERMOOTEN, 1987; SALINAS & CRUZ, 1995; PEREIRA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2001; ALBANESE *et al.*, 2002).

A regressão espontânea não é esperada nos casos naturais e a doença é diagnosticada mais comumente pelo exame citológico e raramente pelo histopatológico (BATAMUSI & KESSY, 1993; ROCHA, 1998ab; MacEWEN, 2001; ROCHA *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, em publicação).

A terapia oncológica recomendada para o TVT é a quimioterapia, a remoção cirúrgica e/ou a radioterapia. A quimioterapia é de escolha pelo sucesso na resposta curativa na grande maioria dos animais portadores de TVT. Apesar disto, uma parcela significativa de animais não responde satisfatoriamente à quimioterapia por exibirem graves efeitos colaterais a esse tratamento, tais como sinais de toxicidade ou resistência à droga (CALVERT *et*

---

*al.*, 1982; CAMACHO & LAUS, 1987; DALECK *et al.*, 1987; OGILVIE, 1996; TINUCCI-COSTA, 1999a; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; MacEWEN, 2001; PAPAZOGLU *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2002).

A atividade proliferativa de células representa um processo biológico cujo entendimento é de grande importância, visto que alterações nesse processo podem estar relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias. Avaliações quantitativa e qualitativa da proliferação celular ao lado do melhor entendimento dos eventos do ciclo celular estão trazendo informações relevantes que podem ter repercussões no manejo terapêutico das neoplasias (PRESTON-MARTIN *et al.*, 1990).

A detecção da atividade proliferativa da célula por meio dos métodos de identificação das regiões organizadoras nucleolares argentofílicas (AgNOR) e do nucléolo pela concentração eletrolítica crítica (CEC) tem contribuído para o monitoramento e respectiva terapêutica de neoplasias, inclusive no TVT (QUINN & WRIGHT, 1990; GREATTI *et al.*, 2004).

As células mantidas em cultura conservam suas propriedades secretoras, fusão, contração, entre outras, fenômenos impossíveis de serem analisados em estudos *in vivo* (ALBERTS *et al.*, 1997). Em vista disso, a contribuição do teste *in vitro*, tem sido muito importante para o aprimoramento de diagnóstico e tratamento de uma variedade de tumores (MISDORP, 1990; ATHANASOU, 1999).

A própolis contém vários componentes químicos e apresenta um amplo espectro de atividades biológicas, tais como: atividade antitumoral, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória e

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tumor venéreo transmissível

#### 2.1.1. Incidência, sexo, raça, idade e forma de transmissão

O tumor venéreo transmissível (TVT) foi inicialmente descrito por Novinsky (1876), e posteriormente por Smith & Washbourn (VERMOOTEN, 1987; MARCHAL *et al.*, 1997; ROGERS, 1997; MacEWEN, 2001), como primeiro tumor transmissível e transplantável (BOOTH, 1994) e mantém essas características desde a primeira descrição até os dias atuais (HASLER & WEBER, 2000). Possui distribuição mundial, prevalecendo em clima tropical e subtropical (VERMOOTEN, 1987; GANDOTRA *et al.*, 1993; BOOTH, 1994, SOBRAL *et al.*, 1998; BOSCOS *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2000; VARASCHIN *et al.*, 2001), principalmente nos países com grande população de cães errantes. Nesses animais, a transmissão e a implantação ocorrem nos locais onde houve a quebra da integridade das mucosas e da pele, que pode ocorrer pelo coito e/ou por disputas de territórios, por exemplo (PAPAZOGLU *et al.*, 2001).

Estudos sobre o TVT de ocorrência natural são extremamente controversos com relação ao sexo, raça e idade. Apesar disso, COHEN (1985) e ROGERS *et al.* (1998) relatam que a ocorrência do TVT é maior em animais adultos, principalmente durante a fase reprodutiva. TINUCCI-COSTA (1994) e



---

SOBRAL *et al.* (1998) reportam que a ocorrência prevalece em fêmeas, pelo fato do número de parceiros durante o período de cio, enquanto PAPAZOGLU *et al.* (2001) e BRANDÃO *et al.* (2002) relatam maior incidência em machos.

Além da transmissão natural, o TVT pode ser induzido experimentalmente (COHEN, 1978; COCKRILL & BEASLEY, 1979; OTOMO *et al.*, 1981; HARMELIN *et al.*, 2001; HARMELIN *et al.*, 2002). Nestas condições, o curso clínico do TVT varia desde a regressão espontânea até a disseminação metastática, dependendo da resposta imune do paciente (COHEN, 1985, ALBANESE *et al.*, 2002; MacLACHLAN & KENEDDY, 2002). Nos animais imunocompetentes, há regressão completa e definitiva em até seis meses. Por outro lado, nos imunossuprimidos, o tumor se desenvolve e até metastatiza (COHEN, 1985; VERMOOTEN, 1987; HARMELIN *et al.*, 2002).

### 2.1.2. Imunologia

Estudos imunológicos demonstram claramente que o TVT é antigênico e que a resposta imune contra o tumor, principalmente a celular, desenvolve papel importante no comportamento biológico da doença, tanto na forma natural como na induzida experimentalmente (TINUCCI-COSTA, 1994; MacEWEN, 2001; ALBANESE *et al.*, 2002).

A resposta imune humoral contra o TVT foi descrita (YANG *et al.*, 1991), estando envolvida na indução da regressão tumoral durante e após a quimioterapia (COHEN, 1985).

Anticorpos da classe IgG anti-TVT podem ser detectados no soro da maioria dos animais que desenvolveram o tumor, independente do estágio da doença (COHEN, 1985; YANG, 1987; FENTON & YANG, 1988; YANG *et al.*, 1991;

---

ROGERS, 1997; MacEWEN, 2001). Esses anticorpos são direcionados contra os antígenos de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II), pelo fato das células do TVT não apresentarem  $\beta_2$ -microglobulina de superfície, o que se faz necessário para expressão dos antígenos de MHC classe I (COHEN *et al.*, 1984). Em vista disto, a presença de anticorpos circulantes em cães adultos e não em cães jovens, pode ajudar a explicar a causa de metástases nestes (FENTON & YANG, 1988).

YANG (1987), PÉREZ *et al.* (1998), CHU *et al.* (2001), HSIAO *et al.* (2002) e LIAO *et al.* (2003), em modelo experimental, dividiram o crescimento biológico do TVT em fases: P, crescimento progressivo, E, estabilidade e R, regressão espontânea. A fase R se caracteriza pelo maior número de linfócitos que secretam fatores, aumentando a expressão de MHC classe I e II, atraindo células CD4+ e CD8+. Na fase P, os sinais de supressão da resposta imune são semelhantes ao que ocorre no homem com neoplasias malignas. Na forma natural, GONZALEZ *et al.* (2000) relatam o predomínio de linfócitos CD8+, desempenhando papel importante na regressão do tumor.

LIAO *et al.* (2003) demonstraram papel importante das células de TVT, pois foram detectadas proteínas secretadas por essas células com especificidade para a indução de apoptose em células B. Essas mesmas proteínas que também são tóxicas para linfócitos B de outras espécies podem ser utilizadas nas doenças que requerem destruição específica das células B, tais como no tratamento de doenças auto-imunes e algumas neoplasias. Por estas razões, o TVT pode se prestar como modelo de investigação da interação entre o crescimento tumoral e o sistema imune do hospedeiro, bem como

---

possível produtor de fármaco, para aquelas doenças (YANG, 1981; HAYES *et al.*, 1983; REHAVI *et al.*, 1991; LIAO *et al.*, 2003).

### 2.1.3. Diagnóstico citopatológico

O exame citológico constitui-se em importante método de diagnóstico na avaliação dos mais diferentes órgãos e doenças. Os métodos citopatológicos datam da metade do século XIX, quando pesquisadores detectaram células anormais nos líquidos corporais como a urina e secreções gástricas. As últimas décadas testemunharam um aumento extraordinário da aplicação da citopatologia a inúmeros órgãos e tecidos do homem e de outros animais de forma que, hoje em dia, ela é considerada uma modalidade rotineira no diagnóstico e no tratamento de tumor (COWEL & TYLER, 1989; WRIGHT & PARRY, 1989; KROGER *et al.*, 1991; ROCHA, 1998ab; MacEWEN, 2001; ROCHA *et al.*, 2001; AMARAL *et al.*, em publicação).

Diversos fatores influenciam a celularidade de uma amostra citopatológica, inclusive o método de amostragem, o instrumental utilizado, a experiência de quem colhe e o tipo de tecido a ser colhido (COWEL & TYLER, 1989; CARVALHO, 1993; ROCHA, 1998ab).

O padrão tissular é perdido nas amostras citopatológicas. Entretanto, a relação entre as células é um critério útil para o diagnóstico. As células podem se apresentar individualizadas, em pequenos grupos, em lâminas de monocamadas ou em grupos tridimensionais. Algumas podem se fundir e formar célula grande multinucleada. O tamanho das células neoplásicas varia muito, de regulares, média a extremamente grandes, enquanto o citoplasma é avaliado

---

para cor, textura e presença de vacúolos únicos ou múltiplos (COWEL & TYLER, 1989; WELLMAN, 1990; FROST, 1991; CARVALHO, 1993).

O tamanho e a forma do núcleo e as alterações da membrana e da cromatina nucleares, a proeminência do nucléolo e a atividade mitótica são parâmetros importantes na avaliação citopatológica (COWEL & TYLER, 1989; FROST, 1991; CARVALHO, 1993).

As características morfológicas de células de TVT podem estar associadas a diferentes linhagens celulares. Essas diferenças podem estar associadas ao comportamento biológico o qual pode interferir no monitoramento desta neoplasia (MOHANTY E RAJYA 1977 ROGERS *et al.*, 1998; VARASCHIN *et al.* 2001).

#### **2.1.4. Marcadores de proliferação celular**

A capacidade proliferativa aumentada é uma das principais características das células neoplásicas (PRESTON-MARTIN *et al.*, 1990). Marcadores do índice de proliferação celular podem ser úteis na avaliação da agressividade da neoplasia e, conseqüentemente, informam o estadiamento e a sensibilidade a protocolos e quimioterapia (QUINN & WRIGHT, 1990).

##### **2.1.4.1. Regiões organizadoras de nucléolos argentofílicas (AgNOR)**

As regiões organizadoras de nucléolo argentofílicas (AgNOR) são alças de DNA que ocorrem no nucléolo das células e possuem genes DNA ribossomais (DERENZINI *et al.*, 1994). As AgNORs estão envolvidas na transcrição do RNA

---

ribossomal durante a interfase, sendo amplamente utilizadas para estimar o estágio celular e a atividade nuclear (CHU *et al.*, 2001). Os genes RNA ribossomais têm importante papel na síntese protéica, crescimento e diferenciação celular (EGAN & CROCKER, 1988).

Existe uma técnica, relativamente simples, eficiente e econômica que utiliza a prata a qual permite identificar e quantificar os AgNORs (VAIL *et al.*, 1996). Por esse método é possível avaliar a taxa de proliferação celular nas neoplasias e conseqüentemente diferenciá-las entre malignas e benignas (DERENZINI & PLOTON, 1991; DESTEXHE *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1998).

Na técnica de impregnação pela prata, AgNORs é possível identificar na interfase três tipos de configurações protéicas: na primeira delas, as NORs estão agregadas formando uma estrutura única, correspondente ao próprio nucléolo - a atividade transcricional nessas células é baixa; no segundo tipo, as NORs são vistas dentro do nucléolo como pontos corados inseridos numa matriz nucleolar - essa configuração é indicativa de estar se iniciando a atividade transcricional; no terceiro tipo, as proteínas AgNORs podem apresentar-se como vários pontos compactos distribuídos pelo núcleo - correspondendo à alta atividade transcricional, característica de células reativas, principalmente neoplásicas (GROTTO, 1990; MOSGOELLER *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1998; MELLO, 2001).

Pelas vantagens que a técnica de AgNOR oferece, ultimamente os pesquisadores sugeriram algumas modificações no sentido de auxiliar na identificação do comportamento biológico das neoplasias. Para tal, esses especialistas no assunto sugerem identificar e/ou quantificar a morfologia das NORs. Nas células de neoplasias de comportamento biológico mais agressivo, as

---

áreas ocupadas pelas AgNORs são menores do que nas de comportamento de menor agressividade (EGAN & CROCKER, 1988; GROTTTO, 1990).

Para averiguar essa informação, pesquisadores reproduziram a nova metodologia em cortes histológicos do TVT na forma natural e de localização genital e extragenital. Os autores avaliaram o comportamento biológico do tumor e concluíram que a técnica se mostrou adequada para indicar o grau de agressividade do tumor, bem como, para emitir posição diante do prognóstico dos animais que participaram do estudo (HARMELIN *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1998; KARADEMIR *et al.*, 1998; CHU *et al.*, 2001).

#### 2.1.4.2. Concentração eletrolítica crítica (CEC)

O nucléolo é a organela celular cuja função é produzir ribossomos. Seu tamanho e forma dependem do estado funcional celular, variando conforme a espécie e, dentro de uma espécie, de tecido para tecido e mesmo de célula para célula (MOSGOELLER *et al.*, 1996; MELLO, 2001).

Em geral, células em proliferação ou metabolicamente ativas têm nucléolos mais proeminentes e em maior número (KAMEL *et al.*, 1990), sempre reconhecidos como organelas celulares que se tornam proeminentes nas lesões proliferativas, essencialmente às neoplasias malignas (BARBISAN *et al.*, 1998). Podem ser observados um ou mais nucléolos por núcleo, porém, a maioria das células possui apenas um nucléolo (MELLO, 2001).

Uma técnica para a visualização do nucléolo, baseada na variante do método de concentração eletrolítica crítica (CEC) para complexos de nucleoproteínas foi proposto por MELLO *et al.* (1993).

---

O método consiste em tratar células com soluções de azul de toluidina na presença de concentrações de íons  $Mg^{2+}$ , de tal forma que complexos ribonucleoproteicos mostrem uma alta metacromasia, enquanto os complexos de DNA-proteínas atingem seu ponto de concentração eletrolítica crítica, perdendo então sua metacromasia (MELLO *et al.*, 1993; MELLO & FALCO, 1996). Neste método, as moléculas de azul de toluidina irão competir com as de  $Mg^{2+}$  pelos mesmos sítios aniônicos no substrato, no caso grupos fosfatos de DNA e RNA. O DNA ligará poucas moléculas de corante e aparecerá corado de forma esverdeada, porque sua concentração crítica de eletrólitos (CEC) terá sido alcançada, enquanto o RNA (especialmente ribossomal) aparecerá corado em violeta (metacromasia) porque sua CEC é superior à do DNA, somente sendo atingida em concentrações de  $Mg^{2+}$  muito mais elevadas (MELLO, 2001).

A técnica é proposta para estudos envolvendo identificação, morfometria e eventuais mudanças na subestrutura do nucléolo ao microscópio de luz (MELLO *et al.*, 1993). Esse método também tem sido proposto como ferramenta útil para rápida identificação e estudos de células apoptóticas (VIDAL *et al.*, 1996; MELLO, 1997).

Por meio de técnicas citoquímicas usuais, como a concentração crítica de eletrólitos (CEC), podem-se obter imagens nucleolares nítidas, possibilitando sua análise morfológica e morfométrica (MELLO *et al.*, 1993).

### 2.1.5. Terapia

O TVT responde a várias formas de terapia: cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. Embora a quimioterapia seja utilizada e a regressão do tumor

---

possa acontecer, há efeitos colaterais tóxicos graves causados por essa conduta terapêutica, necessitando eventualmente a interrupção do tratamento (CALVERT *et al.*, 1982; CAMACHO & LAUS, 1987; DALECK *et al.*, 1987; OGILVIE, 1996; ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000; MacEWEN, 2001; PAPAZOGLU *et al.*, 2001). Dentre esses efeitos, estão: mielossupressão, cardiotoxicidade, problemas gastrintestinais (náusea, vômito, inapetência, diarreia), alopecia e, em alguns casos, neurotoxicidade (KISSEBERTH & MacEWEN, 2001).

Pesquisadores brasileiros têm conseguido constatações importantes, embora incertezas também existam, com relação à resistência à quimioterapia para o TVT (TINUCCI-COSTA, 1999a; BRANDÃO *et al.*, 2002; GASPAR, 2005).

## 2.2. Própolis e o sistema *in vitro*

### 2.2.1. Própolis

As terapias utilizadas para pacientes com tumor não apresentam seletividade para as células neoplásicas. Dessa forma, induzem nas células normais destes pacientes efeitos extremamente severos por interferir no ciclo celular. Como resultado, o tratamento do câncer causa significativa morbidade e mortalidade (KISSEBERTH & MacEWEN, 2001). Portanto, na tentativa de reduzir os efeitos colaterais dos quimioterápicos, a utilização de produtos naturais com atividade antitumoral e imunomoduladora tem sido aventada ultimamente.

A própolis, um produto elaborado pelas abelhas a partir de secreções de árvores, flores, folha e pólen, é um conjunto complexo de substâncias (BANKOVA *et al.*, 1999; BANSKOTA *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004). As abelhas



---

utilizam-na para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares ou insetos e eventuais invasores que morrem no interior da colméia, com a finalidade de evitar sua decomposição (CHEN *et al.*, 2004).

A própolis vem sendo usada na medicina popular, principalmente na Europa, datando de pelo menos 300 a.C. (BANSKOTA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004). Utilizada em várias partes do mundo, incluindo o Japão, Estados Unidos e Europa, aclamada por melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamação, doença cardíaca, diabetes e até mesmo o câncer. Devido a estes fatores, houve grande interesse em identificar a composição química e as propriedades biológicas da própolis (BANSKOTA *et al.*, 2002).

A própolis contém vários componentes químicos e apresenta um amplo espectro de atividade biológica, incluindo: atividade antitumoral, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória e imunomodulatória (ORSI *et al.*, 2000; BANSKOTA *et al.*, 2001; SFORCIN *et al.*, 2002; MURAD *et al.*, 2002; SÁ-NUNES *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004).

A padronização da preparação da própolis é realmente difícil devido à sua complexa composição e atividades farmacológicas resultantes da sua variação geográfica e origem botânica (ASO *et al.*, 2004).

A composição da própolis depende da vegetação da área de onde foi coletada. Própolis da zona temperada contém um predomínio de compostos fenólicos, incluindo flavonóides e derivados do ácido cinâmico (MARCUCCI, 1995). Diterpenóides e compostos prenilatados, que são virtualmente ausentes na própolis de zonas temperadas, são relatados na própolis da América do Sul juntamente com ligantes, flavonóides e outros compostos (BANSKOTA *et al.*,

2002). Mesmo com estas diferenças na composição, a própolis de ambas as regiões possuem propriedades biológicas similares (BANSKOTA *et al.*, 2001).

As atividades antibióticas e imunomoduladoras, bem como os efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes e antitumorais são devidos aos diferentes componentes dos extratos etanólico ou aquoso deste produto (ORSOLIC *et al.*, 2004).

BANKOVA *et al.* (1995) identificaram mais de 200 constituintes na própolis brasileira, porém, várias atividades biológicas ainda não foram bem elucidadas. A própolis é constituída por cera de abelha, flavonóides, compostos fenólicos como o ácido cinâmico e seus ésteres, aldeídos e cetonas (CHEN *et al.*, 2004). O éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) é um dos componentes isolados da própolis e que demonstra atividade antitumoral e antioxidante (SUD'INA *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2004). O CAPE apresentou citotoxicidade nas células de câncer oral, mas não nas células normais (LEE *et al.*, 2003).

Inúmeros pesquisadores têm relatado a propriedade antitumoral da própolis (SCHELLER *et al.*, 1989; BASIC *et al.*, 1995; CHIAO *et al.*, 1995; RAO *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1996; MATSUNO *et al.*, 1997; BANSKOTA *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004). A atividade antitumoral dos flavonóides é devida à indução de apoptose (CHEN *et al.*, 2004). Da própolis brasileira foram isolados 23 componentes, e quatro deles mostraram citotoxicidade contra fibrossarcoma no homem e carcinoma de cólon murino (BANSKOTA *et al.*, 1998). Em 2000, BANSKOTA *et al.* e HIROTA *et al.* isolaram dois novos compostos da própolis brasileira e ambos apresentaram citotoxicidade em células de carcinoma pulmonar humano. CHEN *et al.* (2001) observaram a indução de apoptose em células leucêmicas humanas através do CAPE. BANSKOTA *et al.* (2002)

---

relataram atividade antitumoral dos componentes da própolis contra vários tumores. CHEN *et al.* (2004) relataram a citotoxicidade do propolin C, um dos componentes isolados da própolis, às células de melanoma humano.

Em pacientes asmáticos, estudos foram realizados introduzindo a própolis como um produto nutricional adicionado ao leite. A fórmula nutricional realmente mostrou reduzir a frequência e a severidade dos ataques, possibilitada pela melhoria do sistema imune dos pacientes (KHAYYAL *et al.*, 2003).

Recentemente, frações solúveis em água e formas da própolis natural podem ser aplicadas por via oral ou parenteral, com uma eficácia médica melhorada (ORSOLIC *et al.*, 2003). Um preparado de própolis solúvel em água administrado por gavagem a ratos com carcinoma mamário, demonstrou efetividade antimetastática, sugerindo que o preparado e seus componentes estimularam os macrófagos, influenciando a resposta imune do animal (ORSOLIC *et al.*, 2004). A atividade antimetastática do preparado da própolis solúvel em água parece ser parcialmente devida à sua atividade apoptótica (ORSOLIC *et al.*, 2003). Deste modo, a influência da própolis e seus compostos polifenólicos podem ser úteis em relação ao câncer e em prevenir metástases (ORSOLIC *et al.*, 2004).

### 2.2.2. Sistema *in vitro*

A cultura de células de vertebrados teve início no começo do século XX (CASTRO, 1978; ALBERTS *et al.*, 1997, FRESHNEY, 2000). As técnicas de cultivo são úteis para preservação e acúmulo de materiais para vários estudos. Tem sido observado que as características morfológicas e biológicas são

---

mantidas na maioria das culturas em longo prazo (MISDORP, 1990). A demonstração que tumores humanos também poderiam originar linhagens celulares contínuas encorajou o interesse pela cultura de tecidos humanos. O desenvolvimento da cultura celular favoreceu dois principais ramos da pesquisa na área médica: a produção de vacinas antivirais e uma melhor compreensão das neoplasias (FRESHNEY, 2000).

Os estudos de cultura celular têm aumentado formidavelmente o entendimento da patogênese de certas neoplasias e têm fornecido bases para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento destes tumores (ATHANASOU, 1999). Como as células em cultura mantêm suas propriedades (secreção de colágeno, fusão, contração, entre outras), isso permite o estudo de fenômenos que não são possíveis de serem analisados em tecidos intactos (ALBERTS *et al.*, 1997).

Em 1951, Bloom *et al.* (apud ADAMS *et al.* 1968) relataram o sucesso da cultura, em curto período de tempo, da célula do TVT e, em 1968, ADAMS *et al.* mantiveram as células de TVT em culturas contínuas por mais de 18 meses. Após esse período, estas células tiveram o número de cromossomos e sua distribuição semelhante aos relatados nos TVTs espontâneos. (ADAMS *et al.*, 1981). MOHANTY & RAJYA (1977) e OKAMOTO *et al.* (1988) verificaram que a morfologia celular do tumor mantido em cultura por 56 e 7 dias, respectivamente, era semelhante à do TVT. Em 1979, BESCHORNER *et al.* também realizaram a cultura de células do TVT com o propósito de isolar e caracterizar fatores inibitórios e bloqueadores do tumor. Isso afirma que estudos do TVT feitos *in vitro* podem ser realizados, uma vez que as células não perdem suas características. Assim, a cultura de células do TVT em presença de

produtos naturais, como tratamento alternativo, pode fornecer contribuição inédita e importante junto a este campo de pesquisa.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Geral

Verificar *in vitro* a possível ação antitumoral da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível (TVT) canino.

### 3.2. Específicos

- ◆ Pela técnica de coloração de Giemsa correlacionar a morfologia das células de TVT com o grau de agressividade;
- ◆ Avaliar o índice de proliferação celular nos diferentes tipos morfológicos do TVT utilizando as técnicas das regiões organizadoras de nucléolos argentofílicas (AgNORs) e da concentração crítica de eletrólitos (CEC);
- ◆ Determinar a sensibilidade do TVT à própolis *in vitro*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Câmara de ética em pesquisa

Os proprietários dos animais envolvidos no estudo foram previamente informados quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto esteve de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, protocolo nº 60/2002-CEEA.

### 4.2. Seleção do TVT natural

Participaram deste estudo 77 cães com diagnóstico de TVT de forma natural. Não foi levado em consideração o sexo, a raça e a idade desses animais. Todos fizeram parte do atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu.

Com a finalidade de estabelecer a manifestação clínica do TVT, foram considerados a sua localização, o seu tamanho, o seu tempo de evolução e o seu comportamento biológico. Para a localização, utilizou-se a nomenclatura já padronizada pela literatura especializada no assunto: a genital

---

e a extragenital (GUEDES *et al.*, 1996; PAPAZOGLU, 2001; RODRIGUES, 2001). Para o tamanho, convencionou-se em chamar de pequeno, quando o tumor media até 3 cm Ø; médio, de 3 a 6 cm Ø e grande, acima de 6 cm Ø. Para estabelecer o tempo de evolução, considerou-se a informação obtida pelo proprietário do animal. Assim, dividiu-se em: tumores recentes - com até três semanas de evolução, estabelecidos - de três a oito semanas de evolução ou antigos - superior a oito semanas. Ao comportamento biológico, os tumores foram definidos como primários, não-primários ou recorrentes.

O tamanho do tumor foi estimado no momento da coleta com o auxílio de um paquímetro, utilizando-se o sistema biométrico de três dimensões, quando possível e ponto inicial da medição foi o de maior extensão da lesão.

### 4.3. Exame citopatológico

#### 4.3.1. Punção - CAAF - TVT superficial

A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) foi realizada após assepsia com álcool iodado, com o animal em posição confortável. Dependendo do tamanho da lesão, foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis BD 26G $\frac{1}{2}$  a 22G $\frac{1}{4}$  acopladas às seringas descartáveis de 10 mL, conectadas ao citoaspirador de Valeri (MPJ). Foi realizada a punção da massa seguida da aplicação de pressão negativa, fazendo-se o reposicionamento da agulha sem que ela saísse da mesma. A seguir, a pressão negativa foi desfeita e a agulha foi retirada da massa. O local da punção foi pressionado com algodão embebido em



---

álcool iodado para evitar o sangramento. A agulha foi então desacoplada da seringa, aspirando para dentro da mesma um pequeno volume de ar, suficiente para expulsar o conteúdo da agulha sobre lâminas de microscopia com extremidade fosca, procedendo-se imediatamente à extensão do material (COWEL & TYLER, 1989). As punções foram realizadas no Ambulatório de Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ - UNESP, campus de Botucatu.

#### **4.3.2. Esfoliação - escova ginecológica - TVT profundo**

A escova ginecológica foi utilizada para colher amostras exclusivamente das lesões localizadas nos seios nasais e na genitália, no macho, quando se situava na base do pênis e, na fêmea, quando situado na vagina. Nesses locais, a escova ginecológica entrava em contato com a lesão e girava-se em um mesmo sentido. A amostra obtida foi imediatamente estendida em lâminas de microscopia com extremidade fosca girando-se a escova em sentido contrário ao de coleta. As coletas foram realizadas no Ambulatório de Cirurgia e Reprodução de Pequenos Animais da FMVZ - UNESP, campus de Botucatu.

#### **4.3.3. Processamento das amostras**

Das amostras obtidas, tanto pela punção como pela esfoliação, duas lâminas ainda úmidas eram imersas imediatamente em etanol 95% para coloração pelo método de AgNOR, enquanto outras cinco eram secar ao ar, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa, para a avaliação da morfologia celular e CEC, para avaliação da proliferação celular.

#### 4.3.4. Leitura e classificação das amostras citológicas - Giemsa

Foram selecionadas três lâminas de cada amostra obtida por punção ou esfoliação para a avaliação da morfologia celular (célula com aspecto plasmocitóide ou linfocitóide) ao microscópio de luz em aumento de 400x<sup>1</sup>. A amostra foi considerada adequada quando as células estavam bem conservadas, fixadas, coradas e visíveis sem sobreposição pelas próprias células de TVT, por hemáceas, células inflamatórias ou outros contaminantes.

De acordo com parâmetros morfológicos analisados, as neoplasias foram divididas em três grupos a seguir: a) **TVT linfocitóide**, quando a frequência de células de TVT com morfologia arredondada, citoplasma escasso e núcleo central representando cerca de 90% do volume celular era acima de 60%; b) **TVT plasmocitóide**, quando a frequência de células com morfologia ovóide, citoplasma abundante e núcleo excêntrico ocupando cerca de 50% do volume celular era acima de 60% e c) **TVT misto** quando a celularidade entre os tipos linfocitóide e plasmocitóide não ultrapassava 59% do total das células.

#### 4.4. Marcadores de proliferação celular para avaliar a agressividade dos diferentes grupos morfológicos

##### 4.4.1. Regiões organizadoras nucleolares argentofílicas (AgNOR)

Para a solubilização das proteínas nucleares reativas ao método de AgNOR e facilitar a mensuração das áreas AgNOR-positivas, uma técnica modificada descrita por VIDAL *et al.* (1994) foi utilizada. Deste modo, 70

---

amostras armazenadas em álcool 95°GL foram submetidas à hidratação progressiva por imersão em álcool etílico 70°GL durante 15 minutos, seguido por imersão em água deionizada por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em uma solução de Triton X-100 a 0,5% em PBS, durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após, as lâminas eram lavadas durante 10 minutos em água corrente e coradas pelo método da prata coloidal descrito por PLOTON *et al.* (1986). Esta técnica consistiu da mistura de 2 partes de uma solução aquosa de prata a 50% com uma parte de uma solução aquosa de gelatina a 2% em água deionizada com ácido fórmico 1%. Para a diminuição dos depósitos inespecíficos de prata sobre o material, adotou-se a coloração com lâminas invertidas descritas por CROCKER (1992). Um mL da solução de prata coloidal foi depositado sobre uma bandeja de coloração de polipropileno e as lâminas, com a face do material voltada para baixo, foram depositadas sobre o corante. A bandeja foi mantida em estufa a 37°C por 12 a 15 minutos, em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, deixadas secar, montadas com lamínula e resina sintética (Permound<sup>®</sup>) e a seguir foram submetidas à morfometria (Anexo 6).

#### 4.4.1.1. Leitura das amostras citológicas - AgNOR

Das 70 lâminas selecionadas sem a prévia classificação nos grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto, foram avaliadas 30 células selecionadas ao acaso. O limiar de resolução ("threshold") para os pontos de AgNORs foi selecionado individualmente por lâmina após estabelecer o contraste adequado para cada ponto/lâmina, onde as AgNORs pudessem ser facilmente identificadas. As lâminas foram analisadas através do programa KS 300 versão

---

<sup>1</sup> Jenamed 2-Carls Zeiss

3.0<sup>2</sup> - Zeiss, observadas ao microscópio de luz<sup>3</sup> sob objetiva de imersão (aumento de 1000x), acoplada à câmera SONY CCD - IRIS / RGB, que enviava as imagens para o programa computacional.

Com essa coloração, os pontos bem visíveis de AgNORs nucleolares ou dispersos no núcleo foram identificados e quantificados. Partindo destas medidas, foram obtidos: área média dos pontos no nucléolo (A Pt Nu), a área média dos pontos no núcleo (A Pt N), a área média dos pontos por célula (A Pt C), a área média das AgNORs por nucléolo (A X Nu), a área média das AgNORs por núcleo (A X N), a área média das AgNORs por célula (A X C), bem como o número médio de pontos de NORs por nucléolo (Nº X Pt Nu), por núcleo (Nº X Pt N) e por célula (Nº X Pt C), conforme as fórmulas abaixo:

Área média dos pontos no nucléolo:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nos nucléolos}}{\text{Número de pontos contados nos nucléolos}}$

Área média dos pontos no núcleo:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nos núcleos}}{\text{Número de pontos contados nos núcleos}}$

Área média total dos pontos:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nucleares e nucleolares}}{\text{Número de pontos contados nos nucléolos e núcleos}}$

Área média das AgNORs por nucléolo:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nos nucléolos}}{\text{Número de nucléolos contados}}$

Área média das AgNORs por núcleo:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nos núcleos}}{\text{Número de núcleos contados}}$

Área média total das AgNOR:  $\frac{\sum \text{área de cada ponto de NOR nucleares e nucleolares}}{\text{Número de células contadas}}$

Número médio de pontos de NORs por nucléolo:  $\frac{\text{número de pontos de NOR nos nucléolos}}{\text{Número de nucléolos contados}}$

Número médio de pontos de NORs por núcleo:  $\frac{\text{número de pontos de NOR nos núcleos}}{\text{Número de núcleos contados}}$

<sup>2</sup> Carl Zeiss Vision image processing systems, KS300 - Konton Elektronik, Alemanha.

<sup>3</sup> LEICA DMR, Alemanha.

---

Número de núcleos contados

Número médio de pontos de NORs por célula:  $\frac{\text{número de pontos de NOR nos núcleos e nucléolos}}{\text{Número de núcleos e nucléolos contados}}$

#### 4.4.2. Concentração eletrolítica crítica (CEC)

Para o estabelecimento das concentrações eletrolíticas críticas (CEC), 80 preparações citológicas fixadas em metanol ou álcool 95°GL foram coradas com solução de azul de toluidina a 0,05% em tampão McIlvaine com pH 4, durante 30 a 40 minutos. Imediatamente à coloração, os preparados citológicos foram tratados com solução aquosa de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 0,05M durante 2 a 3 minutos, lavadas rapidamente com água destilada (5 segundos), seca ao ar e montadas com resina Permunt<sup>®</sup> (Anexo 7).

##### 4.4.2.1. Leitura das amostras citológicas - CEC

Das 80 lâminas selecionadas sem a prévia classificação nos grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto, foram avaliadas 50 células sob objetiva de imersão, ao microscópio de luz<sup>4</sup> acoplado à câmera<sup>5</sup>, que enviou as imagens para o programa computacional Image-Pro Plus, versão 4.1<sup>6</sup>.

Na célula, contornos manuais foram realizados em torno do nucléolo e do núcleo com o auxílio de mesa digitalizadora<sup>7</sup>, de modo que foram determinados: a área dos nucléolos (A Nu), a área dos núcleos (A N), a relação nucléolo:núcleo (R Nu:N), o índice de circunferência dos nucléolos (IC Nu), o

---

<sup>4</sup> LEICA DMLS, CN.

<sup>5</sup> SONY CCD - IRIS / RGB, Color Video Camera - Japan - Modelo DXC-107A.

<sup>6</sup> Media Cybernetics. Silver Spring, MD, USA. 1999.

<sup>7</sup> WizardPen, 5x4, Genius.

índice de circunferência dos núcleos (IC N), o diâmetro dos nucléolos (D Nu), o diâmetro dos núcleos (D N), os eixos maiores dos nucléolos (Ema Nu), os eixos menores dos nucléolos (Eme Nu), os eixos maiores dos núcleos (Ema N), os eixos menores dos núcleos (Eme N), o número de nucléolos por célula de TVT (Nº Nu).

## 4.5. Própolis e o sistema *in vitro*

### 4.5.1. Própolis

A coleta da própolis foi realizada no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, localizada na Fazenda Experimental Lageado. Foram utilizadas colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*, Linneaus, 1758) alojadas em colméias de madeira modelo Langstroth. Telas propolisadoras foram colocadas sobre o último componente das caixas de madeira e sob a tampa da colméia. Ao final de um mês, as telas foram retiradas, colocadas em freezer e, decorridas 24 horas, foram preparadas (distendidas e friccionadas) para liberação da própolis (TOTH, 1985).

A própolis foi triturada e, em seguida, soluções de própolis a 30% em álcool etílico (Synth®) a 70% foram preparadas e deixadas ao abrigo da luz, sob agitação freqüente, durante 7 dias. Decorrido este período, as soluções foram filtradas e utilizadas para o preparo das concentrações utilizadas nos ensaios biológicos (SFORCIN *et al.*, 2000).

#### 4.5.2. Cultura celular (sistema *in vitro*)

A concentração de própolis utilizada, o número e o tempo de incubação das células de TVT com própolis foram determinados em experimentos pilotos realizados no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Botucatu, São Paulo (Anexo 18).

Como a amostra de TVT colhida pela técnica citopatológica oferecia material insuficiente para a padronização do teste *in vitro*, o método de coleta foi substituído pela retirada de fragmentos do tumor pelo ambulatório de cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ. Sem a prévia classificação pelo Giemsa nos grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto, esse material foi imediatamente transportado para o Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, em meio RPMI 1640 completo (enriquecido com 15% de soro bovino fetal e L-glutamina - 2mM). As células de TVT foram isoladas por meio de maceração com gaze sobre placa de vidro. Posteriormente, esse material foi lavado com meio RPMI 1640 por centrifugação a 1500 rpm/10 minutos e a viabilidade e a concentração celular foram determinadas pelo teste de exclusão em azul de Tripán. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 enriquecidos com 15% de soro bovino fetal e L-glutamina (2mM) para ter-se  $2 \times 10^6$  células/mL. 100  $\mu$ l da suspensão celular foram distribuídos em cada poço da placa de microtitulação de 96 poços (fundo chato) e as culturas foram observadas ao microscópio invertido e depois incubadas a 37°C em ar umidificado com 5% de CO<sub>2</sub>.

---

A própolis, diluída no mesmo meio, foi incluída nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/well, para analisar seu efeito após 6, 24 e 48 horas, comparando a viabilidade e a concentração das células tratadas com própolis com as células controle. A viabilidade e concentração celulares foram avaliadas pelo método de exclusão em azul de Tripán. Para observar um possível efeito do solvente da própolis, algumas células foram incubadas somente com álcool etílico 70%. Os experimentos foram todos realizados em duplicatas.

#### 4.6. Análise estatística

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o teste de Friedman para os períodos de tempo e o teste de Kruskal-Wallis para as concentrações de própolis.

Para avaliar a concentração celular, foi utilizado o teste de Análise de Variância para Experimento em Blocos e, para comparação pareada múltipla, utilizou-se o método de Holm-Sidak.

A comparação dos valores médios de AgNORs para os diferentes grupos morfológicos foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) com verificação de significância pelo teste de Tukey. Para comparação dos valores médios de AgNORs entre tumores primários e não-primários, utilizou-se o teste "t" e, para comparação entre as massas genitais e extragenitais, utilizou-se o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação dos valores médios obtidos pela técnica de CEC, para os diferentes grupos morfológicos, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Na comparação dos valores entre tumores primários e não-primários e, na



comparação entre os tumores genitais e extragenitais, para dados com distribuição normal utilizou-se o teste "t". Dados que não preencheram este requisito foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Observações gerais

Para a melhor compreensão, optou-se por apresentar os resultados em etapas assim distribuídas: expressão clínica do tumor nos cães, avaliação morfológica das células de TVT, marcadores do índice de proliferação celular, e influência da própolis nas células do TVT *in vitro*. Nessas etapas, serão apresentados todos os parâmetros que demonstraram alterações significativas entre os grupos e aqueles biologicamente relevantes.

### 5.2. Manifestação clínica do tumor

As raças dos 77 cães que participaram do trabalho foram distribuídas das seguintes formas: Sem Raça Definida (60 cães), seguida por Poodle (4 cães), Boxer e Pastor Alemão (3 cães cada), Teckel, Pastor Belga, Weimaraner, Fox Paulistinha, Cocker, Sheepdog e Pointer (1 cão cada). Com relação ao sexo, o número de machos foi maior (51,94%) do que o de fêmeas (48,06%) (Anexos 3 a 5).

Como houve uma grande variação na idade (1 a 18 anos), além daqueles dos quais os proprietários não souberam informar a idade, optou-se

---

por agrupar em quatro faixas etárias: a) 0 a 6 anos (51 animais - 66,23%), b) 7 a 12 anos (11 animais - 14,29%), c) 13 a 18 anos (3 animais - 3,90%) e d) animais com idade desconhecida (12 animais - 15,58%). A localização preferencial do tumor em todos os animais foi a genitália (57 animais - 74,03%). O tamanho do tumor foi uniforme em todos os animais. O tempo de evolução do tumor que prevaleceu foi o antigo (35 animais - 45,45%). O comportamento biológico predominante foi o de tumores primários (58 animais - 75,32%). Embora de modo não-significativo, os animais inclusos na faixa etária de 0 a 6 anos de idade apresentaram mais parâmetros de manifestação clínica de TVT do que os animais de outras faixas etárias (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

**TABELA 1 - Distribuição dos cães que participaram do estudo de acordo com a manifestação clínica: faixa etária, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico do TVT forma natural.**

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	NÚMERO DE ANIMAIS = 77			
	0-6	7-12	13-18	Desconhecida*
<b>LOCALIZAÇÃO</b>				
Genital	34	11	3	9
Extragenital	11	-	-	1
Genital e extragenital	6	-	-	2
<b>TAMANHO (cm)</b>				
P	16	2	2	2
M	17	6	1	5
G	14	3	-	3
P + M + G*	4	-	-	2
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO (semanas)</b>				
Recente	5	1	1	1
Estabelecido	14	4	1	2
Antigo	26	6	-	3
Desconhecido	4	-	1	6
R + E + A**	2	-	-	-
<b>COMPORTAMENTO BIOLÓGICO</b>				
Primário	36	10	3	9
Não-primário	8	-	-	1
Recorrente	1	1	-	-
P + NP***	6	-	-	2

\* P = até 3 cm Ø; M = de 3 a 6 cm Ø; G = acima de 6 cm Ø.

\*\* R = até 3 semanas de evolução; E = de 3 a 8 semanas de evolução; A = superior a 8 semanas de evolução.

\*\*\* P = primário - sítio de implantação e/ou transplante inicial; NP = não-primário - sítio de implantação e/ou transplante secundário; R = recorrente - recidiva após tratamento.

• Idade desconhecida = proprietário não soube informar.



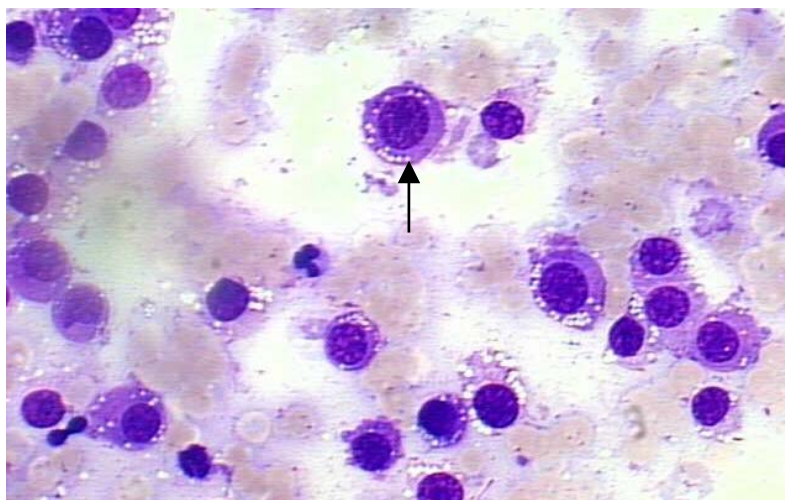
**FIGURA 1** - Cão adulto com estágio avançado de tumor venéreo transmissível acometendo pênis (localização genital) e região inguinal (extragenital). Observar o aumento de volume e a deformidade da região acometida (setas).



**FIGURA 2** - Cão adulto com estágio avançado de tumor venéreo transmissível acometendo cavidade oral (localização extragenital). Observar a deformidade da região acometida (seta).

### 5.3. Padronização morfológica do TVT

As amostras de células de TVT padronizadas de acordo com a morfologia celular foram assim distribuídas: a) TVT linfocitóide (Figura 3), 21 amostras, 22,83%; b) TVT plasmocitóide (Figura 4), 41 amostras, 44,57% e c) TVT misto (Figura 5), 30 amostras, 32,60%. No total, foram 92 amostras, pois 11 dos 77 animais apresentaram acima de um tumor por localização (Figura 6 e Anexos 3 a 5).



**FIGURA 3 - Grupo linfocitóide:** quando era composto de uma população de células acima de 60% com aspecto de linfócito - citoplasma escasso vacuolado e núcleo central (seta). Giemsa, 640x.

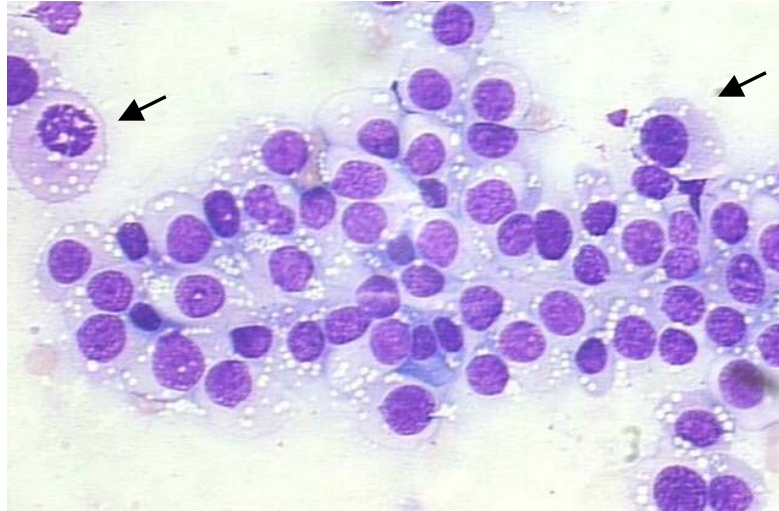


FIGURA 4 - Grupo plasmocitóide: quando era composto de população de células acima de 60% com aspecto de plasmócitoide - citoplasma amplo e vacuolado, núcleo excêntrico (setas). Giemsa, 640x.

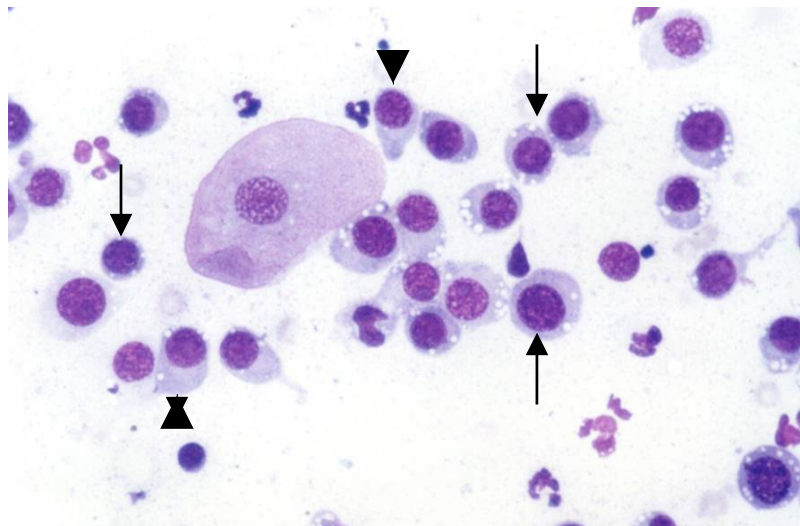


FIGURA 5 - Grupo misto: quando era composto de população de células de aspecto linfocitóide (cabeça de seta) e plasmocitóide (seta) que não ultrapassava de 59%. Giemsa, 640x.



FIGURA 6 - Cão adulto com estágio avançado de tumor venéreo transmissível acometendo pênis (localização genital) e pele (extragenital - setas). Observar o aumento de volume e a deformidade da região genital (cabeça de seta).

Quando se compararam os grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto com a faixa etária dos animais, observou-se que o grupo plasmocitóide estava presente em todas as faixas etárias, inclusive com predomínio para os animais entre 0 a 6 anos de idade (Tabela 2). Essa mesma comparação foi observada nos parâmetros de tempo de evolução e do comportamento biológico.

Por outro lado, houve predomínio do grupo linfocitóide nesses parâmetros nos animais de faixas etárias de 13 a 18 anos e o grupo misto nos de idade desconhecida.



TABELA 2 - Distribuição das neoplasias nos Grupos Linfocitóide, Plasmocitóide e Misto e sua correlação à faixa etária, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico do TVT forma natural.

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	NEOPLASIAS = 92											
	0-6			7-12			13-18			Desconhecida <sup>†</sup>		
	L	P	M	L	P	M	L	P	M	L	P	M
<b>LOCALIZAÇÃO</b>												
Genital	8	20	13	3	4	4	2	1	-	4	4	3
Extragenital	4	12	6	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<b>TAMANHO (cm) *</b>												
Pequeno	5	8	8	-	1	1	2	-	-	1	1	3
Médio	6	9	7	2	1	3	-	1	-	2	2	3
Grande	1	15	4	1	2	-	-	-	-	1	1	1
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO (semanas) **</b>												
Recente	-	3	3	-	-	1	1	-	-	1	-	-
Estabelecido	4	8	5	-	3	1	-	1	-	-	1	2
Antigo	6	18	11	3	1	2	-	-	-	1	-	2
Desconhecido	2	3	-	-	-	-	1	-	-	2	3	3
<b>COMPORTAMENTO BIOLÓGICO ***</b>												
Primário	10	18	14	2	4	4	2	1	-	4	4	3
Não-primário	2	12	5	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Recorrente	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

\* P = até 3 cm Ø; M = de 3 a 6 cm Ø; G = acima de 6 cm Ø.

\*\* R = até 3 semanas de evolução; E = de 3 a 8 semanas de evolução; A = superior a 8 semanas de evolução.

\*\*\* P = primário - sítio de implantação e/ou transplante inicial; NP = não-primário - sítio de implantação e/ou transplante secundário; R = recorrente - recidiva após tratamento.

♦ Idade desconhecida = proprietário não soube informar.

L = linfocitóide; P = plasmocitóide; M = misto.

## 5.4. Marcadores do índice de proliferação celular

### 5.4.1. AgNOR

As 70 amostras dos 77 animais utilizadas para medir o índice de proliferação celular pelo AgNOR (Figura 7) foram distribuídas da seguinte

forma: Grupo linfocitóide, 20 amostras, 28,57%, Grupo plasmocitóide, 28 amostras, 40%, Grupo misto, 22 amostras, 31,43% (Anexos 8 a 13).

Independente da faixa etária, a positividade do AgNOR no grupo plasmocitóide foi observada em todos os animais. Porém, essa positividade é mais pronunciada na faixa etária de 0 a 6 anos, e, dentro desta faixa, essa positividade de AgNOR é também relevante na localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico do TVT, quando se compara com os outros animais e seus respectivos parâmetros avaliados (Tabela 3).

**TABELA 3 -** Freqüência de amostras de acordo com a manifestação clínica (idade, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico) nos grupos morfológicos, no índice de proliferação celular pelo AgNOR.

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	NEOPLASIAS = 70											
	0-6			7-12			13-18			Desconhecida*		
	L	P	M	L	P	M	L	P	M	L	P	M
<b>LOCALIZAÇÃO</b>												
Genital	8	12	8	3	2	2	1	-	-	4	3	3
Extragenital	4	11	5	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<b>TAMANHO (cm) *</b>												
Pequeno	5	5	3	-	1	-	1	-	-	1	1	3
Médio	6	6	6	2	-	2	-	-	-	2	1	3
Grande	1	12	4	1	1	-	-	-	-	1	1	1
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO (semanas) **</b>												
Recente	-	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Estabelecido	4	6	2	-	2	1	-	-	-	-	-	2
Antigo	6	11	11	3	-	1	-	-	-	1	-	2
Desconhecido	2	3	-	-	-	-	1	-	-	2	3	3
<b>COMPORTAMENTO BIOLÓGICO ***</b>												
Primário	10	10	9	2	2	2	1	-	-	4	3	3
Não-primário	2	11	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Recorrente	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

\* P = até 3 cm Ø; M = de 3 a 6 cm Ø; G = acima de 6 cm Ø

\*\* R = até 3 semanas de evolução; E = de 3 a 8 semanas de evolução; A = superior a 8 semanas de evolução

\*\*\* P = primário - sítio de implantação e/ou transplante inicial; NP = não-primário - sítio de implantação e/ou transplante secundário; R = recorrente - recidiva após tratamento

♦ Idade desconhecida = proprietário não soube informar

L = linfocitóide; P = plasmocitóide; M = misto



**FIGURA 7** - Núcleo de células de TVT: identificação e quantificação das regiões organizadoras para avaliar a proliferação celular. Observar os pontos de AgNOR dispersos no núcleo (cabeças de seta) e no nucléolo (seta). AgNOR, 1000x.

Os valores das AgNORs dos diferentes grupos morfológicos estão listados na Tabela 4. Comparando-se os valores entre os grupos, houve diferença significativa apenas no valor de número de NORs por nucléolo, quando comparado o grupo linfocitóide com o grupo plasmocitóide. Por outro lado, isto não foi observado entre os grupos linfocitóide e misto, nem tampouco entre o grupo misto com o grupo plasmocitóide.

Embora não tenha havido diferença significativa nos demais valores estudados, vale a pena ressaltar que no grupo plasmocitóide os valores de área média de pontos no nucléolo, área média de pontos por célula, área média das

AgNORs por nucléolo e área média das AgNORs por célula foram maiores do que os outros dois grupos (linfocitóide e plasmocitóide).

TABELA 4 - Distribuição das medidas do índice de proliferação celular pelo AgNOR nos Grupos Linfocitóide, Misto e Plasmocitóide do TVT, forma natural.

	MORFOLOGIA		
	Linfocitóide (n=20)	Misto (n=22)	Plasmocitóide (n=28)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>			
A Pt Nu	1,20 $\pm$ 0,82	1,42 $\pm$ 1,05	1,66 $\pm$ 0,98
A Pt N	0,24 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,13
A Pt C	0,54 $\pm$ 0,23	0,55 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,43
A X Nu	1,83 $\pm$ 1,31	1,88 $\pm$ 1,06	2,20 $\pm$ 1,14
A X N	1,39 $\pm$ 1,11	0,86 $\pm$ 0,74	0,97 $\pm$ 0,79
A X C	3,40 $\pm$ 1,80	2,91 $\pm$ 1,06	3,38 $\pm$ 1,80
<b>NÚMERO DE PONTOS</b>			
N X Pt Nu	1,77 $\pm$ 0,64 <sup>A</sup>	1,53 $\pm$ 0,39 <sup>AB</sup>	1,43 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>
N X Pt N	5,01 $\pm$ 3,86	4,06 $\pm$ 3,43	4,33 $\pm$ 2,78
N X Pt C	6,95 $\pm$ 3,75	5,81 $\pm$ 3,36	5,87 $\pm$ 2,69

Resultados expressos em média e desvio padrão de 70 lâminas.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

A Pt Nu = Área média dos pontos no nucléolo; A Pt N = Área média dos pontos no núcleo; A Pt C = Área média dos pontos por célula; A X Nu = Área média das AgNORs por nucléolo; A X N = Área média das AgNORs por núcleo; A X C = Área média das AgNORs por célula; N X Pt Nu = Número médio de pontos de NORs por nucléolo; N X Pt N = Número médio de pontos de NORs por núcleo; N X Pt C = Número médio de pontos de NORs por célula.

Estudando o comportamento biológico dos tumores, primários e não-primários, houve diferença significativa apenas na área média dos pontos no núcleo, sendo que os tumores primários apresentaram valores maiores (Tabela 5).

TABELA 5 - Distribuição dos valores médios do índice de proliferação celular pelo AgNOR e sua correlação com o comportamento biológico, primário e não-primário, no TVT na forma natural.

	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	
	Primários (n=46)	Não-primários (n=46)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		
A Pt Nu	1,32 $\pm$ 0,91	1,70 $\pm$ 1,04
A Pt N	0,24 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	0,19 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>
A Pt C	0,61 $\pm$ 0,36	0,56 $\pm$ 0,19
A x Nu	1,87 $\pm$ 1,06	2,23 $\pm$ 1,18
A x N	1,05 $\pm$ 0,97	1,05 $\pm$ 0,76
A x C	3,17 $\pm$ 1,77	3,37 $\pm$ 1,68
<b>NÚMERO DE PONTOS</b>		
N X Pt Nu	1,62 $\pm$ 0,51	1,44 $\pm$ 0,27
N X Pt N	4,27 $\pm$ 3,45	4,81 $\pm$ 3,03
N X Pt C	6,09 $\pm$ 3,38	6,29 $\pm$ 2,95

Resultados expressos em média e desvio padrão de 70 lâminas.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

A Pt Nu = Área média dos pontos no nucléolo; A Pt N = Área média dos pontos no núcleo; A Pt C = Área média dos pontos por célula; A X Nu = Área média das AgNORs por nucléolo; A X N = Área média das AgNORs por núcleo; A X C = Área média das AgNORs por célula; N X Pt Nu = Número médio de pontos de NORs por nucléolo; N X Pt N = Número médio de pontos de NORs por núcleo; N X Pt C = Número médio de pontos de NORs por célula.

Quando comparado à localização dos tumores (genitais e extragenitais), houve diferença significativa apenas na área média de pontos de NORs por núcleo, sendo maior nos tumores genitais (Tabela 6).

TABELA 6 - Distribuição da mediana do índice de proliferação celular pelo AgNOR e sua correlação com a localização, genital e extragenital, no TVT na forma natural.

	LOCALIZAÇÃO	
	Genitais (n=47)	Extragenitais (n=45)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		
A Pt Nu	1,27	1,08
A Pt N	0,21 <sup>A</sup>	0,19 <sup>B</sup>
A Pt C	0,52	0,50
A x Nu	1,74	1,40
A x N	0,90	0,73
A x C	3,33	3,04
<b>NÚMERO DE PONTOS</b>		
N X Pt Nu	1,47	1,43
N X Pt N	4,60	4,16
N X Pt C	6,33	5,93

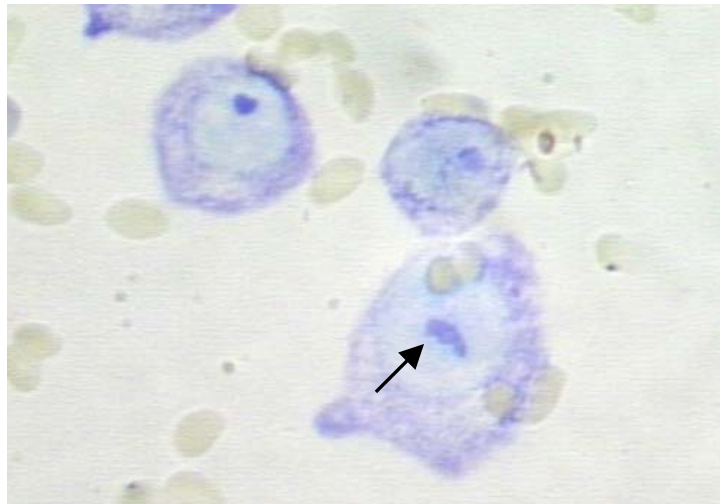
Resultados expressos em média e desvio padrão de 70 lâminas.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

A Pt Nu = Área média dos pontos no nucléolo; A Pt N = Área média dos pontos no núcleo; A Pt C = Área média dos pontos por célula; A X Nu = Área média das AgNORs por nucléolo; A X N = Área média das AgNORs por núcleo; A X C = Área média das AgNORs por célula; N X Pt Nu = Número médio de pontos de NORs por nucléolo; N X Pt N = Número médio de pontos de NORs por núcleo; N X Pt C = Número médio de pontos de NORs por célula.

#### 5.4.2. CEC

Para o índice de proliferação celular pelo CEC (Figura 08), foram utilizadas 80 amostras dos 77 animais. As amostras foram obtidas e agrupadas de acordo com as características celulares em: 20 casos no Grupo linfocitóide - 25%, 35 casos (43,75%) no Grupo plasmocitóide e 25 casos (31,25%) no Grupo misto; 56 casos foram primários (70%) e 57 (71,25%) foram de localização genital (Anexos 14 a 17).



**FIGURA 8** - Núcleo de células de TVT: identificação e quantificação dos nucléolos para avaliar a proliferação celular. Observar a atipia no nucléolo (seta) CEC, 1400x.

O grupo plasmocitóide se manifestou em todas as faixas etárias e predominou nas de 0 a 6 anos. Nessa faixa etária, a localização, tamanho e tempo de evolução o grupo plasmocitóide também apresentou predomínio quando se compara com as outras faixas etárias. Por outro lado, nesses mesmos parâmetros avaliados, o grupo linfocitóide predominou nas faixas etárias de 13 a 18 anos e o grupo misto no de idade desconhecida (Tabela 7).

TABELA 7 - Frequência de amostras de acordo com a manifestação clínica (idade, localização, tamanho, tempo de evolução e comportamento biológico) nos grupos morfológicos, no índice de proliferação celular pelo CEC.

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	NEOPLASIAS = 80											
	0-6			7-12			13-18			Desconhecida*		
	L	P	M	L	P	M	L	P	M	L	P	M
<b>LOCALIZAÇÃO</b>												
Genital	7	18	9	3	3	3	1	-	-	4	4	3
Extragenital	4	12	5	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<b>TAMANHO (cm) *</b>												
Pequeno	5	7	3	-	1	-	1	-	-	1	1	3
Médio	5	10	7	2	1	3	-	-	-	2	2	3
Grande	1	13	4	1	1	-	-	-	-	1	1	1
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO (semanas) **</b>												
Recente	-	3	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Estabelecido	4	8	3	-	3	1	-	-	-	-	1	2
Antigo	5	16	11	3	-	1	-	-	-	1	-	2
Desconhecido	2	3	-	-	-	-	1	-	-	2	3	3
<b>COMPORTAMENTO BIOLÓGICO ***</b>												
Primário	9	16	10	2	3	3	1	-	-	4	4	3
Não-primário	2	12	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Recorrente	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

\* P = até 3 cm Ø; M = de 3 a 6 cm Ø; G = acima de 6 cm Ø

\*\* R = até 3 semanas de evolução; E = de 3 a 8 semanas de evolução; A = superior a 8 semanas de evolução

\*\*\* P = primário - sítio de implantação e/ou transplante inicial; NP = não-primário - sítio de implantação e/ou transplante secundário; R = recorrente - recidiva após tratamento

♦ Idade desconhecida = proprietário não soube informar

L = linfocitóide; P = plasmocitóide; M = misto

Das medidas realizadas, não houve diferença significativa quando comparadas entre os diferentes grupos morfológicos. Porém, no grupo plasmocitóide, os valores de área dos nucléolos, índice de circunferência dos nucléolos, diâmetro dos nucléolos, eixos maiores dos nucléolos, eixos menores dos nucléolos, número de nucléolos e diâmetro dos núcleos são maiores do que os dos grupos linfocitóide e grupo misto. Os valores médios para cada medida de cada grupo estão apresentados na Tabela 8.



**TABELA 8** - Distribuição dos valores médios do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com os Grupos linfocitóide, plasmocitóide e misto no TVT na forma natural.

	MORFOLOGIA		
	Linfocitóide (n=20)	Misto (n=25)	Plasmocitóide (n=35)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>			
Área dos nucléolos	3,90 $\pm$ 1,11	4,21 $\pm$ 1,92	4,36 $\pm$ 1,81
Área dos núcleos	65,61 $\pm$ 18,89	73,36 $\pm$ 16,22	71,97 $\pm$ 16,72
<b>ÍNDICES DE CIRCUNFERÊNCIA</b>			
Índice de circunferência dos nucléolos	0,92 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,02
Índice de circunferência dos núcleos	0,97 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,01
<b>DIÂMETROS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
Diâmetro dos nucléolos	2,15 $\pm$ 0,29	2,17 $\pm$ 0,41	2,37 $\pm$ 0,57
Diâmetro dos núcleos	9,13 $\pm$ 0,81	9,41 $\pm$ 0,90	9,50 $\pm$ 1,10
<b>EIXOS MAIORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
Eixos maiores dos nucléolos	2,78 $\pm$ 0,35	2,87 $\pm$ 0,60	3,01 $\pm$ 0,70
Eixos maiores dos núcleos	10,11 $\pm$ 0,81	10,36 $\pm$ 1,13	10,4 $\pm$ 1,15
<b>EIXOS MENORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
Eixos menores dos nucléolos	2,06 $\pm$ 0,44	2,09 $\pm$ 0,52	2,15 $\pm$ 0,52
Eixos menores dos núcleos	8,61 $\pm$ 0,71	8,87 $\pm$ 1,02	8,88 $\pm$ 1,01
<b>NÚMERO DE NUCLÉOLOS</b>			
Número de nucléolos	1,08 $\pm$ 0,13	1,05 $\pm$ 0,11	1,10 $\pm$ 0,21
<b>RELAÇÃO NUCLÉOLO: NÚCLEO</b>			
Relação nucléolo: núcleo	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02

Resultados expressos em média e desvio padrão de 80 lâminas.

Estudando o comportamento biológico dos tumores, primários e não-primários, houve diferença significativa nas medidas de área de nucléolo, relação nucléolo:núcleo, e eixo menor do nucléolo. Os valores para essas medidas foram maiores nos tumores primários (Tabela 9).

**TABELA 9** - Distribuição das medianas do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com o comportamento biológico, primário e não-primário, no TVT na forma natural.

	COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	
	Primários (n=56)	Não-primários (n=24)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		
Área dos nucléolos	3,94 <sup>A</sup>	3,34 <sup>B</sup>
Área dos núcleos	69,60	63,93
<b>ÍNDICES DE CIRCUNFERÊNCIA</b>		
Índice de circunferência dos nucléolos	0,92	0,93
Índice de circunferência dos núcleos	0,97	0,98
<b>DIÂMETROS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Diâmetro dos nucléolos	2,19	2,05
Diâmetro dos núcleos	9,22	8,98
<b>EIXOS MAIORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Eixos maiores dos nucléolos	2,79	2,66
Eixos maiores dos núcleos	10,17	9,93
<b>EIXOS MENORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Eixos menores dos nucléolos	1,99 <sup>A</sup>	1,85 <sup>B</sup>
Eixos menores dos núcleos	8,68	8,46
<b>NÚMERO DE NUCLÉOLOS</b>		
Número de nucléolos	1,00	1,00
<b>RELAÇÃO NUCLÉOLO: NÚCLEO</b>		
Relação nucléolo: núcleo	0,06 <sup>A</sup>	0,05 <sup>B</sup>

Resultados expressos em mediana de 80 lâminas.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

Quando se compara a localização dos tumores houve apenas diferença significativa na área de nucléolo, relação nucléolo:núcleo, eixo menor do nucléolo e diâmetro do nucléolo, sendo que as medianas para os tumores genitais foram maiores (Tabela 10).

**TABELA 10** - Distribuição das medianas do índice de proliferação celular pelo CEC e sua correlação com a localização, genital e extragenital no TVT forma natural.

	LOCALIZAÇÃO	
	Genital (n=57)	Extragenital (n=23)
<b>ÁREAS (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>		
Área dos nucléolos	3,91 <sup>A</sup>	3,38 <sup>B</sup>
Área dos núcleos	70,12	65,36
<b>ÍNDICES DE CIRCUNFERÊNCIA</b>		
Índice de circunferência dos nucléolos	0,92	0,93
Índice de circunferência dos núcleos	0,97	0,98
<b>DIÂMETROS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Diâmetro dos nucléolos	2,18 <sup>A</sup>	2,05 <sup>B</sup>
Diâmetro dos núcleos	9,48	9,19
<b>EIXOS MAIORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Eixos maiores dos nucléolos	2,79	2,69
Eixos maiores dos núcleos	10,16	10,01
<b>EIXOS MENORES (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Eixos menores dos nucléolos	2,00 <sup>A</sup>	1,85 <sup>B</sup>
Eixos menores dos núcleos	8,69	8,53
<b>NÚMERO DE NUCLÉOLOS</b>		
Número de nucléolos	1,00	1,00
<b>RELAÇÃO NUCLÉOLO: NÚCLEO</b>		
Relação nucléolo: núcleo	0,06 <sup>A</sup>	0,05 <sup>B</sup>

Resultados expressos em mediana de 80 lâminas.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

## 5.5. Cultura celular e própolis

Comparando as células tratadas com própolis com as células controle, obtiveram-se os resultados expostos nas Tabelas 11 e 12, Figuras 9 e 10 e Anexos 1 e 2.

TABELA 11 - Viabilidade celular (%) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação, com diferentes concentrações de própolis.

GRUPO	TEMPO (h)			
	0	6	24	48
Controle	52,07 <sup>Aa</sup>	81,41 <sup>Aa</sup>	76,12 <sup>Aa</sup>	60,83 <sup>Aa</sup>
P* (10 µg)	52,07 <sup>Aa</sup>	44,38 <sup>Abab</sup>	9,39 <sup>ABab</sup>	1,47 <sup>Babc</sup>
P* (25 µg)	52,07 <sup>Aa</sup>	31,56 <sup>Abab</sup>	1,00 <sup>ABab</sup>	0,00 <sup>Babc</sup>
P* (50 µg)	52,07 <sup>Aa</sup>	0,41 <sup>Abab</sup>	0,00 <sup>ABb</sup>	0,00 <sup>Bb</sup>
P* (100 µg)	52,07 <sup>Aa</sup>	0,00 <sup>Abb</sup>	0,00 <sup>ABb</sup>	0,00 <sup>Bc</sup>
Álcool (20 µl)	51,30 <sup>Aa</sup>	41,60 <sup>Abab</sup>	41,63 <sup>Abab</sup>	40,98 <sup>Aab</sup>

Para cada grupo, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os períodos de tempo, com  $\alpha=0,05$ .

Para cada período de tempo, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, com  $\alpha=0,05$ .

P\* - Diferentes concentrações de própolis (animais tratados).

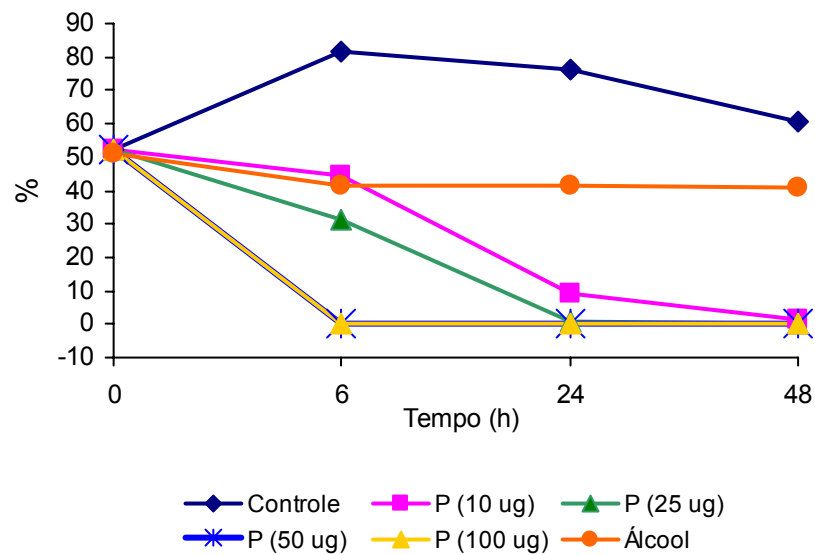


FIGURA 9 - Viabilidade celular (%) do tumor venéreo transmissível após incubação por 6, 24 e 48 horas, com diferentes concentrações de própolis (P).

TABELA 12 - Concentração celular ( $\times 10^6$  céls./ml) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação com diferentes concentrações de própolis.

GRUPO	TEMPO (h)			
	0	6	24	48
Controle	2,00 <sup>Aba</sup> $\pm$ 0,00	2,52 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0,31	1,70 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,42	1,15 <sup>Ca</sup> $\pm$ 0,27
P (10 $\mu$ g)	2,00 <sup>ACab</sup> $\pm$ 0,00	1,28 <sup>CDbc</sup> $\pm$ 1,25	0,28 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 0,30	0,08 <sup>BDb</sup> $\pm$ 0,13
P (25 $\mu$ g)	2,00 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,00	0,96 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 0,95	0,08 <sup>Cbc</sup> $\pm$ 0,11	0,02 <sup>Cb</sup> $\pm$ 0,03
P (50 $\mu$ g)	2,00 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,00	0,31 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 0,63	0,03 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 0,04	0,01 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,01
P (100 $\mu$ g)	2,00 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,00	0,02 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,04	0,01 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,02	0,00 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,00
Álcool (20 $\mu$ l)	2,00 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,00	0,95 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 1,04	0,84 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0,86	0,77 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0,54

Para cada grupo, entre os períodos de tempo, e para cada momento, entre os grupos, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas, pela Análise de Variância para Experimento em blocos, com  $\alpha=0,05$  e  $p<0,02$ .  
P \* - Diferentes concentrações de própolis (animais tratados).

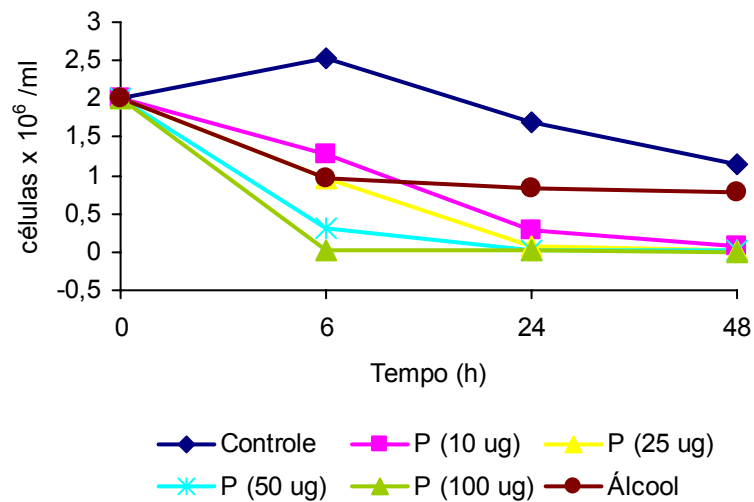


FIGURA 10 - Concentração celular ( $\times 10^6$  céls./ml) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação com diferentes concentrações de própolis (P).

---

As células tratadas somente com álcool etílico 70% apresentaram valores similares ao das células controle, o que indicou a ausência de efeito do veículo em que a própolis se encontrava.

A própolis apresentou atividade tempo-dose dependente sobre as células de TVT. Após 48 horas e na concentração de 100 µg, a atividade antitumoral foi efetiva sobre as células de TVT, incluindo as de morfologia plasmocitóide, que só tiveram total efeito da própolis com a maior concentração da própolis, bem como no maior tempo de exposição (Anexos 1 e 2).

## 6. DISCUSSÃO

Estudos sobre o TVT de ocorrência natural são extremamente controversos no que diz respeito a sexo, raça e idade. DAS & DAS (2000) relataram que cães de qualquer idade, raça e sexo são suscetíveis ao desenvolvimento do TVT. A maior frequência é de cães com 2 a 5 anos de idade, porém, quando em áreas endêmicas, cães acima de um ano de idade podem desenvolver o TVT. Esse trabalho foi realizado em área endêmica e a idade dos animais variou de 1 a 18 anos com predomínio de 3 a 6 anos. Esse resultado está de acordo com os encontrados por DAS & DAS (2000) e SOUSA *et al.* (2000). COHEN (1985) e ROGERS *et al.* (1998) relatam que a ocorrência do TVT é maior em animais adultos, principalmente durante a fase reprodutiva. TINUCCI-COSTA (1994) e SOBRAL *et al.* (1998) reportam que a ocorrência prevalece em fêmeas, pelo fato do número de parceiros durante o período de cio, enquanto PAPAZOGLU *et al.* (2001) e BRANDÃO *et al.* (2002) relatam maior incidência em machos.

O diagnóstico do tumor venéreo transmissível (TVT) é de fundamental importância pelo fato dessas células se assemelharem com as de outras neoplasias como linfoma, plasmocitoma, mastocitoma e histiocitoma,

---

principalmente se os TVTs forem de localização extragenital (CANGUL, 2001; MacLACHLAN & KENEDDY, 2002).

O motivo de esse trabalho abranger mais a manifestação clínica do TVT do que o encontrado na literatura deve-se ao fato de que na rotina de atendimento do Hospital Veterinário da UNESP, campus de Botucatu, São Paulo, o número de cães com diagnóstico de tumor venéreo Transmissível (TVT) vem aumentando progressivamente, representando o segundo mais freqüente, sendo superado apenas pelo tumor de mama (HATAKA, 2003; AMARAL, 2005).

Em vista disso, 77 cães com diagnóstico de TVT pelo exame citopatológico, que mostrou ser uma excelente ferramenta no diagnóstico dessa neoplasia, de acordo com DALECK *et al.* (1987), COWEL & TYLER (1989), ROCHA (1998ab), McKEE *et al.* (2001) e PAPAZOGLU *et al.* (2001), foram submetidos à técnica de citologia aspirativa por agulha fina, não havendo complicações decorrentes do procedimento e foram possíveis todos os diagnósticos.

A localização do TVT é classificada pelos autores em genital e extragenital, com predileção para a genitália externa, independente do sexo (FENTON & YANG 1988; ROGERS 1997; ALBANESE *et al.* 2002). Os resultados deste trabalho concordam com os mencionados. Verificou-se que, dos 77 cães machos e fêmeas participantes do estudo, 57 (74,03%) apresentaram o TVT na localização genital.

São ausentes os trabalhos que comentam sobre o tamanho do TVT distribuindo-o em categorias. Apesar da distribuição uniforme do tamanho do tumor, houve maior número de animais com tumor classificado como grande (acima de 6 cm de Ø). O tempo de evolução predominante foi o antigo, com



---

mais de 8 semanas (35 animais - 45,45%). Esses dados são condizentes com os de SOUSA *et al.* (2000) e MacLACHLAN & KENNEDY (2002).

Não é possível definir uma célula tumoral em termos absolutos. As células neoplásicas são normalmente conhecidas por apresentarem crescimento anormal pelos vários fatores envolvidos nesse processo. Mesmo assim, a busca de indicadores citomorfológicos, principalmente aqueles que auxiliam no índice proliferativo de tumores são incansáveis (QUINN & WRIGHT, 1990; PRESTON-MARTIN *et al.*, 1990; CARVALHO, 1993).

São escassas ou ausentes as pesquisas que investigam por meio de exame citopatológico, utilizando os marcadores de proliferação celular, para melhor compreensão do comportamento biológico do TVT. Tampouco investigações que particularizem critérios citomorfológico ou ainda sua correlação com a terapia indicada e seus efeitos colaterais, no sentido minimizá-los.

O comportamento biológico do TVT definido como primário, não-primário e recorrente, foi incluído nesse trabalho com o objetivo de correlacionar o local com a agressividade do tumor. Essa denominação é pioneira no Hospital Veterinário da FMVZ - UNESP, campus de Botucatu (BRANDÃO *et al.* 2002). O número de animais com tumores primários foi de 58 (75,32%).

A coloração de Giemsa triou os casos de TVT e permitiu a separação do tumor nos três diferentes grupos morfológicos (linfocitóide, plasmocitóide e misto).

---

Das 66 neoplasias obtidas de tumores de localização genital, houve predomínio da morfologia plasmocitóide (43,94%), seguida da morfologia mista (30,30%). Os tumores extragenitais apresentaram a mesma tendência de prevalência da morfologia plasmocitóide onde, das 26 amostras, 46,15% possuíam esta morfologia.

Neste estudo, houve três casos primários com localização ocular, oral e nasal, ou seja, o sítio primário de implantação foi esses locais, não havendo comprometimento genital. Destes três casos, 2 apresentaram morfologia linfocitóide e 1 apresentou morfologia mista. Nos casos primários, 40,91% apresentaram a morfologia plasmocitóide e 31,82% eram de morfologia mista. No nosso estudo, apenas 2 animais (2,60%) apresentaram recorrência, porém, um deles teve recorrência duas vezes após o tratamento. BRANDÃO *et al.* (2002) verificaram uma taxa de recidiva de 16,7% nos animais tratados por sulfato de vincristina, dois a três meses após o término do tratamento. Com relação ao tempo de evolução, houve prevalência de tumores antigos, com mais de oito semanas (47,82% dos casos). Pode-se inferir que esses tumores não apresentariam mais a regressão espontânea relatada por COHEN (1985) e por HARMELIN *et al.* (2002). Dentre os tumores antigos, a prevalência foi da morfologia plasmocitóide (48,91%).

Diferenças podem existir na linhagem celular do TVT quanto à característica morfológica, influenciando o comportamento biológico (ROGERS *et al.*, 1998).

As diferenças morfológicas observadas por MOHANTY & RAJYA (1977), ROGERS *et al.* (1998) e VARASCHIN *et al.* (2001) também foram verificadas nos

---

animais com diagnóstico de TVT no Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ - UNESP, campus de Botucatu. Apesar de haverem observações das diferenças morfológicas nos TVTs, nenhum autor os classificou em diferentes grupos morfológicos, criando nova nomenclatura para cada morfologia. Deste modo, este trabalho implantou uma nova nomenclatura para o TVT e, de acordo com a com as características do tipo celular predominante, foram denominados TVT "linfocitóide", TVT "plasmocitóide" e TVT "misto", sendo então uma inovação não encontrada na literatura.

Através da separação das amostras nesses grupos, observou-se um predomínio da morfologia do TVT plasmocitóide (41 casos - 44,57%). Dados do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, sugerem que os TVTs com essa morfologia necessitam de um maior número de aplicações de vincristina para a regressão (dados não publicados). Considerando os relatos de TINUCCI-COSTA (1999a) e BRANDÃO *et al.* (2002), quanto aos casos de resistência à quimioterapia, pode-se acreditar que a morfologia nestes animais é diferente.

Esses dados do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, que sugerem que os TVTs com essa morfologia necessitam de um maior número de aplicações de vincristina para a regressão (dados não publicados), juntamente com os achados por AMARAL (2005) e por GASPAR (2005), onde os TVTs com morfologia plasmocitóide apresentaram maior frequência de anormalidades nucleares, juntamente com a maior expressão de glicoproteína-P e maior índice de metástases levaram-nos a crer que os TVTs

---

com morfologia plasmocitóide são mais agressivos que os com morfologia linfocitóide ou mista.

Nos trabalhos científicos, especializados no assunto, não se tem conhecimento da aplicação da técnica de AgNOR em citologia do TVT. Em patologia veterinária, as referências são escassas e a utilização desta técnica ainda é inexpressiva. HARMELIN *et al.* (1995) e SANTOS *et al.* (1998) utilizaram AgNORs para avaliar prognóstico e localização dos TVTs, porém utilizou-se de cortes histológicos. O emprego dessa coloração em citologia advém de estudos realizados na citologia no homem (QUINN & Wright, 1990; VAIL *et al.*, 1996).

Comparando-se as medidas das AgNORs nos três diferentes grupos morfológicos, obtivemos diferença estatística apenas no valor de números de NORs por nucléolo. Porém, ao observarmos os valores de área média de pontos no nucléolo e por célula, a área média dos AgNORs por nucléolo e por célula, pode-se dizer que nos animais com morfologia plasmocitóide esses valores são superiores aos dos outros grupos.

SANTOS *et al.* (1998) encontraram, nos cortes histológicos, valores médios e máximos de AgNOR para tumores de localização genital menores que os de localização extragenital. No nosso estudo, o oposto foi observado, apesar de não ter havido diferença significativa entre eles, apenas na área média de pontos por núcleo.

Quando comparamos os tumores primários com os não-primários, a área média dos pontos de AgNOR no nucléolo foi a única medida estatisticamente significativa.

---

HARMELIN *et al.* (1995) relatam que, nos grupos de animais com comportamento maligno, os valores médios de número de AgNOR por núcleo e a área de AgNOR por núcleo eram maiores. SANTOS *et al.* (1998) salientam que as neoplasias malignas tendem a apresentar AgNORs menores, mais difusas e mais numerosas que as benignas. Neste estudo, as neoplasias de morfologia linfocitóide, as primárias e as genitais (consideradas de menor malignidade) apresentaram os valores maiores, o que condiz com o relatado por SANTOS *et al.* (1998).

Nesse trabalho, imagens nucleolares bem contrastadas foram obtidas com a coloração de CEC, favorecendo a análise do material.

Não há dados ainda na literatura sobre morfometria e coloração por CEC com relação ao TVT, comparando-se os diferentes tipos morfológicos. Estudos realizados por GREATTI *et al.* (2004) com a coloração de CEC em células de TVT mostraram diferença estatística significativa quando comparando área nucleolar dos tumores antes da quimioterapia e após a primeira aplicação do quimioterápico, sugerindo que a quimioterapia induziu a diminuição da atividade nucleolar e, conseqüentemente, da taxa de proliferação celular. Nesse estudo, nas medidas realizadas no nucléolo e núcleo, comparando-se os três grupos morfológicos, podemos observar que, nos tumores com morfologia plasmocitóide, as medidas são maiores em todas as medidas realizadas - excetuando-se área nuclear, relação nucléolo:núcleo e índice de circunferência do núcleo, sugerindo uma maior atividade nucleolar e, conseqüentemente, uma maior taxa de proliferação celular nesse grupo. Na comparação dos tumores genitais com os extragenitais e dos primários com os

---

não-primários, todas as medidas (excetuando-se as de índice de circunferência) foram maiores nos genitais e nos primários. Houve diferença significativa quanto à área de nucléolo, relação nucléolo:núcleo e eixo menor de nucléolo em ambas as comparações. THOMSON (1990) afirmou que tumores malignos se caracterizam por maior relação nucléolo:núcleo; o nosso estudo não condiz com o citado. Essa diferença deve-se, provavelmente, pela diferente técnica utilizada.

PAPAZOGLU *et al.* (2001) citam que o comportamento biológico e a patogênese das formas extragenitais do TVT ainda não estão bem estabelecidas. ROGER *et al.* (1998) não puderam determinar se o comportamento biológico dos tumores extragenitais é diferente dos genitais. Pela técnica de AgNOR e CEC, quando comparados os tumores genitais com os extragenitais, houve diferença quanto ao número de pontos de AgNOR por nucléolo, na área de nucléolo, na relação nucléolo:núcleo e no eixo menor do nucléolo, podendo pressupor um comportamento biológico diferente entre esses tumores, assim como comparando os primários com os não-primários.

Os resultados morfométricos obtidos neste estudo possibilitaram distinguir o TVT de localização genital dos extragenitais, bem como os primários dos não-primários.

Comparando-se as duas técnicas de marcadores de proliferação celular, podemos dizer que a técnica de coloração pelo CEC se mostrou mais econômica, mais simples no momento da coloração dos preparados citológicos, bem como mais fácil de se analisar.

---

Mesmo a análise digitalizada das imagens, considerada um método sofisticado, rápido e relativamente seguro, apresenta algumas limitações. Das quais se destacam: a dificuldade na padronização da densidade óptica das AgNORs para a sua binarização; variações na intensidade das colorações nas técnicas de AgNOR e CEC; dificuldades nos contornos manuais para o CEC, mesmo com o auxílio da mesa digitalizadora.

O procedimento quimioterápico continua sendo o tratamento de eleição para os pacientes com TVT, porém, em grande parte dos animais, há efeitos colaterais tóxicos graves causados por essa conduta terapêutica, necessitando a interrupção do tratamento (OGILVIE, 1996). Além disso, as constatações feitas por TINUCCI-COSTA (1999a) e BRANDÃO *et al.* (2002) relatam a resistência de alguns TVTs à quimioterapia.

Baseado nas informações que podem existir diferenças na linhagem celular do TVT influenciando seu comportamento biológico (MOHANTY & RAJYA, 1977; ROGERS *et al.*, 1998 e VARASCHIN *et al.*, 2001), nos dados do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu, que os TVTs com a morfologia plasmocitóide necessitam de um maior número de aplicações de vincristina para a regressão (dados não publicados), nos dados achados por AMARAL (2005) e por GASPAR (2005), onde os TVTs com morfologia plasmocitóide apresentaram maior frequência de anormalidades nucleares, juntamente com a maior expressão de glicoproteína-P e maior índice de metástases, na observação que os valores de área média de pontos no nucléolo e por célula, a área média dos AgNORs por nucléolo e por célula são superiores, nos animais com morfologia plasmocitóide e na observação que nos tumores

---

com morfologia plasmocitóide as medidas nucleolares são maiores sugerindo uma maior atividade nucleolar e, conseqüentemente, uma maior taxa de proliferação celular nesse grupo, acreditamos que os TVTs com morfologia plasmocitóide são mais agressivos que os com morfologia linfocitóide ou mista.

Deste modo, na tentativa de reduzir os efeitos colaterais dos quimioterápicos, principalmente nos casos de TVT com morfologia plasmocitóide, que necessita de maior número de aplicações de vincristina e, considerando que a própolis possui atividade antitumoral, antimetastática e imunomoduladora, novos estudos sobre sua introdução como procedimento terapêutico poderiam trazer uma grande contribuição quanto ao curso clínico do TVT.

Vários autores estudaram a atividade antitumoral da própolis (MATSUNO *et al.*, 1997; BANSKOTA *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004), porém, nenhum estudo associou a própolis com o tumor venéreo transmissível, o que demonstra o ineditismo de nosso trabalho e a grande contribuição para futuro procedimento terapêutico.

Para a realização da cultura celular, foi necessário realizar biópsias, pois o número de células necessárias não era suficiente através da citologia, salvo se várias punções fossem realizadas.

Neste trabalho, pudemos observar que as células de TVT são sensíveis à própolis *in vitro*, pois houve diminuição na viabilidade e concentração celular tanto ao longo do tempo (0 a 48 h), bem como após incubação com concentrações progressivas de própolis (10 a 100 µg), quando comparado com as células controle.



Nas células tratadas somente com álcool etílico 70%, verificou-se a ausência de efeito do veículo em que a própolis se encontrava, sugerindo que os resultados obtidos foram exclusivamente devidos aos componentes da própolis.

A própolis apresentou atividade tempo-dose dependente sobre as células de TVT. Após 48 horas e na concentração de 100 µg, a atividade antitumoral foi efetiva sobre as células de TVT, incluindo às de morfologia plasmocitóide (consideradas mais agressivas), que só tiveram total efeito da própolis com a maior concentração desta, bem como no maior tempo de exposição.

Uma vez que há supressão da resposta imune durante a fase P, que o tumor metastatiza em animais imunossuprimidos e que a própolis apresenta atividade imunomoduladora, além da antitumoral, podemos aventar a hipótese de que a própolis, administrada por via oral, possa apresentar efeito antitumoral e imunoestimulante, sendo útil para o tratamento do TVT e até mesmo de outras neoplasias.

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- A própolis apresenta efeito citotóxico sobre as células de TVT *in vitro*, de forma tempo-dose dependentes, nos três grupos morfológicos;
- Os marcadores de proliferação celular (AgNOR e CEC) mostram-se eficientes para monitorar a evolução do TVT e diferenciar a morfologia, localização e comportamento biológico;
- A avaliação clínica, morfológica e o estudo *in vitro* auxiliam no diagnóstico, na conduta terapêutica e na monitoração do TVT.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>§</sup>

ADAMS, E.W.; CARTER, L.P.; SAPP, W.J. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture. *Cancer Research*, Baltimore, v.28, p.753-757, abr. 1968.

ADAMS, E.W.; SAPP, W.J.; CARTER, L.P. Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v.71, n.3, p.336-346, jul. 1981.

ALBANESE, F.; POLI, A.; MILLANTA, F.; *et al.* Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with *Leishmania*-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? *Veterinary Dermatology*, Oxford, v.13, p.243-246, 2002.

ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J. *et al.* Como as células são estudadas. In: ALBERTS, B; BRAY, D.; LEWIS, J. *et al.* (Eds). **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.156-162.

AMARAL, A.S. **Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA**. 2005, 228p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMARAL, A.S.; GASPAR, L.F.J.; SILVA, S.B.; *et al.* Exame citológico como método diagnóstico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu,

---

<sup>§</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro, 2000. 22p.  
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

---

Brasil (Estudo Retrospectivo: 1994-2002). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa (Aceito para publicação em 2004).

ASO, K.; KANNO, S.I.; TADANO, T.; *et al.* Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v.27, n.5, p.727-730, 2004.

ATHANASOU, N.A. Cell and organ culture in the understanding of bone and its neoplasms. In: HELLIWELL, T.R. *Pathology of bone and joint neoplasms*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. p.34-58.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M. *et al.* Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, v.54, n.5-6, p.401-405, maio/jun. 1999.

BANKOVA, V.; CRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z. Nat. Sect. C. Biosci.*, v.50, p.167-172, 1995.

BANSKOTA, A.H.; TEKUZA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, London, v.15, p.561-571, 2001.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; *et al.* Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v.63, p.1277-1279, 2000.

BANSKOTA, A.H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L.Y.; *et al.* Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v.80, p.67-73, 2002.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v.61, n.7, p.896-900, 1998.

BARBISAN, L.F.; RUSSO, J.; MELLO, M.L.S. Nuclear and nucleolar image analysis of human breast epithelial cells transformed by benzo[a]pyrene and transfected

with the c-Ha-ras oncogene. *Analytical Cellular Pathology*, Amsterdam, v.16, n.4, p.193-199, 1998.

BASIC, I.; CURIC, S.; TADIC, Z. *et al.* L'activité antimetastatique du venin d'abeille et de l'extrait aqueux de propolis chez la souris. In: CONGRESS INTERNATIONAL D'APICULTURE, 34; 1995, Lausanne. *Abstracts...* Lausanne: Apimondia, 1995. p.140.

BATAMUZI, E.K.; KESSY, B.M. Role of exfoliative cytology in the diagnosis of canine transmissible venereal tumour. *Journal of Small Animal Practice*, London, v.34, p.399-401, 1993.

BESCHORNER, W.E.; HESS, A.D.; NERENBERG, S.T. *et al.* Isolation and characterization of canine venereal tumor-associated inhibitory and blocking factors. *Cancer Research*, Baltimore, v.39, n.10, p.3920-3927, out. 1979.

BOOTH, M.J. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. *Journal of Small Animal Practice*, London, v.35, n.1, p.39-42, 1994.

BOSCOS, C.M.; TONTIS, D.K.; SAMARTZI, F.C. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. *Canine Practice*, Santa Barbara, v.24, n.4, p.6-11, 1999.

BRANDÃO, C.V.S.; BORGES, A.G.; RANZANI, J.J.T.; *et al.*, Tumor venéreo transmissível: estudo retrospectivo de 127 casos (1998-2000). *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*, São Paulo, v.5, n.1, p.25-31, 2002.

CALVERT, C.A.; LEIFER, C.E.; MacEWEN, E.G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v.181, n.2, p.163-164, jul. 1982.

CAMACHO, A.A.; LAUS, J.L. Estudo sobre a eficiência da vincristina no tratamento de cães com tumor venéreo transmissível. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v.3, n.1, p.37-42, 1987.

CANGUL, I.T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. *Veterinary Sciences Tomorrow*, v.4, p.1-19, dez. 2001.

CARVALHO, G. *Citologia Oncológica*. São Paulo: Atheneu, 1993. 295p.

CASTRO, M.P. Cultura de células de tecidos animais: um esboço histórico. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS, 10. 1978, São Paulo. *Anais...* São Paulo, ACIESP, 1978. p.1-4.

CATONE, G. MARINO, G.; POGLAYEN, M.; *et al.* Canine transmissible venereal tumour parasited by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*, Amsterdam, v.27, p.549-553, 2003.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; LIN, J.K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome *c* release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*, New York, v.67, p.53-66, 2004.

CHEN, Y.J.; SHIAO, M.S.; WANG, S.Y. The Antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs*, v.12, n.2, p.143-149, fev. 2001.

CHIAO, C.; CAROTHERS, A.M.; GRUNBERGER, D. *et al.* Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblasts cells. *Cancer Research*, Baltimore, v.55, p.3576-3583, ago. 1995.

CHU, R.M.; LIN, C.Y.; YANG, S.Y.; *et al.* Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Research*, Athens, v.21, n.6a, p.4017-4024, nov./dez., 2001.

COCKRILL, J.M.; BEASLEY, J.N. Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, v.40, n.3, p.409-410, 1979.

COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. *Advances in Cancer Research*, New York, v.43, p.75-112, 1985.

COHEN, D. The transmissible venereal tumor of the dog - a naturally occurring allograft? A review. *Israel Journal of Medical Sciences*, Jerusalem, v.14, n.1, p.14-19, jan. 1978.

COHEN, D.; SHALEV, A.; KRUP, M. Lack of  $\beta_2$ -microglobulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v.72, n.2, p.395-401, fev. 1984.

COWEL, R.L.; TYLER, R.D. Cytology of cutaneous lesions. *Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice*, Philadelphia, v.19, p.769-794, 1989.

CROCKER, J. Nucleolar organizer regions and fibrillar centres. In: HERRINGTON, C.S.; MCGEE, J.O'D. (Eds). *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. Oxford : Medical Publications, v.1, 1992. p.221-238.

DALECK, C.L.M.; DALECK, C.R.; FERREIRA, H.I. *et al.* Novos estudos sobre o tratamento do tumor venéreo transmissível canino (TVT). *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v.3, n.2, p.203-209, 1987.

DAS, U; DAS, A.K. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Veterinary Research Communications*, Amsterdam, v.24, n.8, p.545-556, 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Review International of Experimental Pathology*, v.32, p.149-192, 1991.

DERENZINI, M.; SIRRI, V.; TRERE, D. Nucleolar organizer regions in tumor cells. *Cancer Journal*, New York, v.7, p.71-74, 1994.

DESTEXHE, E.; VANMANSHOVEN, P.; COIGNOUL, F. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *American Journal Veterinary Research*, Chicago, v.56, n.2, p.185-187, 1995.

EGAN, M.; CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *Journal of Pathology*, Sussex, v.154, p.247-253, mar. 1988.

ERÜNAL-MARAL, N.; FINDIK, M.; ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period

in the bitch. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Hannover, v.107, n.5, p.175-180, maio 2000.

FENTON, M.A.; YANG, T.J. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology*, Basel, v.45, n.3, p.210-213, 1988.

FERREIRA, A.J.A.; JAGGY, A.; VAREJÃO, A.P. *et al.* Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, London, v.41, n.4, p.165-168, 2000.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells*. New York: Wiley-Liss, 2000. 577p.

FROST, J.K. Pathologic process affecting cells from inflammation to cancer. In: BIBBO, M. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: Saunders, 1991. cap.6, p.68-82.

GANDOTRA, V.K.; CHAUHAN, F.S.; SHARMA, R.D. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. *Indian Veterinary Journal*, Madras, v.70, p.854-857, 1993.

GASPAR, L.F.J. *Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia*. 2005, 143p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GONZALEZ, C.M.; GRIFFEY, D.K.; NAYDAN, D.K.; *et al.* Canine transmissible venereal tumor: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *Journal of Comparative Pathology*, Edinburgh, v.122, n.4, p.241-248, 2000.

GREATTI, W.F.P.; AMARAL, A.S.; SILVA, S.B.; *et al.* Índices proliferativos do tumor venéreo transmissível canino pelas técnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v.9, n.1, p.53-59, 2004.



---

GROTTO, H.Z.W. **Regiões organizadoras de nucléolo na hematopoiese normal e nas leucemias agudas.** 1990, 99p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUEDES, R.M.C.; NOGUEIRA, R.H.G.; SANTOS, S.R.Q. *et al.* Tumor venéreo transmissível (TVT) extragenital em um cão: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, n.3, p.369-374, 1996.

HARMELIN, A.; PINTHUS, J.H.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D. *et al.* Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.86, n.3-4, p.245-249, jul. 2002.

HARMELIN, A.; PINTHUS, J.H.; KATZIR, N. *et al.* Use of a murine xenograft model for canine transmissible venereal tumor. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.62, n.6, p.907-911, jun. 2001.

HARMELIN, A.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. Correlation of AgNOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.112, p.429-433, 1995.

HASLER, A.H.; WEBER, W.T. Theriogenology question of the month. Transmissible venereal tumor (TVT). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.216, n.10, p.1557-1559, maio 2000. Errata em: Theriogenology question of the month. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.217, n.1, p.42, jul. 2000.

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

---

HAYES JR, H.M.; BIGGAR, R.J.; PICKLE, L.W. *et al.* Canine transmissible venereal tumor: a model for Kaposi's sarcoma? **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.117, n.1, p.108-109, jan. 1983.

HIROTA, M.; MATSUNO, T.; FUJIWARA, T.; *et al.* Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer of a benzopyran derivative of propolis. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.366-370, 2000.

HSIAO, Y.W.; LIAO, K.W.; HUNG, S.W.; *et al.* Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.87, p.19-27, 2002.

HUANG, M.T.; MA, W.; YEN, P. *et al.* Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v.17, n.4, p.761-765, 1996.

KAMEL, H.M.H.; KIRK, J.; TONER, P.G. Ultrastructural pathology of the nucleus. In: UNDERWOOD, J.C.E. (Ed.). **Current opinion pathology: pathology of the nucleus**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. cap.32, p.16-65.

KARADEMIR, N.; GÜVENC, T.; YARIM, M.; *et al.* Differentiation of transmissible venereal tumor and canine cutaneous histiocytoma with argyrophil nucleolar organizer regions (AgNORs) staining. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Tel Aviv, v.53, n.2, p.73-75, 1998.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; *et al.* A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v.17, p.93-102, 2003.

KISSEBERTH, W.C.; MacEWEN, E.G. Complications of cancer and its treatment. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. (Eds). **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.198-232.

KROGER, D.; GREY, R.M.; BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. *Canine Practice*, Santa Barbara, v.16, n.6, p.17-21, nov./dez. 1991.

LEE, Y.J.; KUO, H.C.; CHU, C.Y.; *et al.* Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, New York, v.66, p.2281-2289, 2003.

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

MacEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MacEWEN, E.G. (Eds). *Small animal clinical oncology*. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.651-656.

MacLACHLAN, N.J.; KENEDDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: MEUTEN, D.J. (Ed). *Tumors in domestic animals*. 4.ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p.572-573.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; *et al.* Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.57, n.1-2, p.1-11, jun. 1997.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Paris, v.26, n.2, p.83-99, 1995.

MATSUNO, T.; CHEN, C.; BASNET, P. A tumoricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. *Medical Science Research*, Kew, v.25, p.583-584, 1997.

McKEE, G.T. *Citopatologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1997. 374p.

MEJÍA, G.E.G. *Regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata (AgNORs) em linfossarcoma de bovinos adultos*. 1998, 106p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.2, p.257-264, 1997.

MELLO, M.L.S. Nucléolo. In: CARVALHO, H.F.; RECCO, S.M. (Eds). **A célula 2001**. 1.ed. São Paulo: Ed. Manole, 2001. p.101-110.

MELLO, M.L.S.; FALCO, J.R.P. Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in spermatozoal and somatic cell nuclei of the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.26, n.8-9, p.793-795, 1996.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; DANTAS, M.M.; *et al.* Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Kyoto, v.26, n.1, p.1-3, 1993.

MISDORP, W. General considerations. In: MOULTON, J.E. (Ed). **Tumors in domestic animals**. 3 ed. London: University of California Press, 1990. p.1-22.

MOHANTY, G.C.; RAJYA, B.S. Growth and morphological characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. **Veterinary Pathology**, Washington, v.14, n.4, p.420-425, jul. 1977.

MOSGOELLER, W.; JORDAN, E.G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. News and views on the nucleolus in 1996. **Bioll. Cell**, v.88, p.1-4, 1996.

MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C. *et al.* Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.79, p.331-334, 2002.

OGILVIE, G.K. Chemotherapy. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. (Eds.) **Small animal clinical oncology**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1996. cap.9, p.70-86.

OKAMOTO, Y.; FUJINAGA, T.; TAJIMA, M.; *et al.* Isolation and cultivation of canine transmissible sarcoma cells. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.50, n.1, p.09-13, 1988.

---

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C. *et al.* Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals Toxins**, Botucatu, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.84, p.265-273, 2003.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.H.; SVER, L.; *et al.* Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.94, p.307-315, 2004.

OTOMO, K.; KOIKE, T.; KUDO, T. *et al.* Histological and ultrastructural findings of regressing canine transmissible venereal tumor after repeated transplantation. **Japanese Journal Veterinary Science**, Tokyo, v.43, p.823-832, 1981.

PAPAZOGLU, L.G.; KOUTINAS, A.F.; PLEVRAKI, A.G.; *et al.* Primary intranasal Transmissible Venereal Tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. **Journal of Veterinary Medicine Series A - Phys., Pathol., Clin. Med.**, Berlin, v.48, n.7, p.391-400, set. 2001.

PEREIRA, J.S.; SILVA, A.B.F.; MARTINS, A.L.B.; *et al.* Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Ophtalmology**, v.3, n.1, p.43-47, 2000.

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

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; *et al.* Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochemical Journal**, v.18, p.5-14, 1986.

PRESTON-MARTIN, N.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K. *et al.* Increased cell division as a

---

cause of human cancer. *Cancer Research*, Baltimore, v.50, n.23, p.7415-7421, dez. 1990.

QUINN, C.M.; WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and application as a prognostic variables. *Journal of Pathology*, Chichester, v.160, p.93-102, 1990.

RAO, C.V.; DESAI, D.; RIVENSON, A. *et al.* Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Research*, Baltimore, v.55, p.2310-2315, jun. 1995.

RECHAVI, G.; KATZIR, N.; RAMOT, B. Kaposi's sarcoma among AIDS patients: transmissible venereal tumor by cell engraftment? *Medical Hypotheses*, Penrith, v.34, n.4, p.380-341, abril 1991.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina em medicina veterinária (I). *Cães e Gatos*, n.75, p.14-16, 1998a.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) - parte II - Diagnósticos obtidos pela CAAF em 1.961 pacientes, entre 1994 e 1998, na FMVZ - Unesp, Botucatu. *Cães e Gatos*, n.79, p.14-15, 1998b.

ROCHA, N.S., RAHAL, S.C., SCHMITT, F., DI SANTI, G.W. Citologia aspirativa por agulha fina como método de auxílio durante a cirurgia. *Cães e Gatos*, n.98, p.22-23, 2001.

RODRIGUES, G.N.; ALESSI, A.C.; LAUS, J.L. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.1, p.141-143, 2001.

ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumor. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, Princeton Junction, v.19, n.9, p.1036-1045, set. 1997.

ROGERS, K.S.; WALKER, M.A.; DILLON, H.B. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Golden, v.34, n.6, p.463-470, nov./dez. 1998.

---

SALINAS, E.M.; CRUZ, G.G. Frecuencia de tumor venéreo transmissible en perros de la ciudad de México entre 1985 y 1993. *Veterinaria Mexico*, Mexico, v.26, n.3, p.173-275, 1995.

SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H.; SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v.87, n.1, p.93-97, 2003.

SANTOS, F.G.A.; GUEDES, R.M.C.M.; CASSALI, G.D. *et al.* Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.50, n.6, p.665-672, 1998.

SHELLER, S.; KROL, W.; SWIACIK, J. *et al.* Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. *Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, v.44c, p.1063-1065, 1989.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C.A.M. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v.73, p.243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, Botucatu, v.8, n.1, p.19-29, 2002.

SOBRAL, R.A.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A. Ocorrência do tumor venéreo transmissível em cães na região de Jaboticabal. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v.14, n.1, p.1-10, 1998.

SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDI, A.B.; *et al.* Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. *Archives of Veterinary Sciences*, Curitiba, v.5, p.41-48, 2000.

---

SUD'INA, G.F.; MIRZOEVA, O.K.; PUSHKAREVA, M.A.; *et al.* Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.329, n.1-2, p.21-24, ago. 1993.

THOMSOM, W. Propolis. *Medical Journal of Australia*, Glebe, v.153, p.654, 1990.

TINUCCI-COSTA, M. Utilização do fator de transferência dialisável (TFd) e RNA imune na imunoterapia de cães portadores naturais do tumor venéreo transmissível (TVT). 1994, 129p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TINUCCI-COSTA, M. Canine transmissible venereal tumor. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*, São Paulo, v.2, n.3, p.46-52, 1999a.

TINUCCI-COSTA, M. Tumor venéreo transmissível canino: estudos imunoistoquímicos e de transplantações xenogênicas e alogênicas. 1999, 149p. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

TOTH, G. Propolis: medicine or fraud? *American Bee Journal*, Hamilton, v.125, n.5, p.337-338, 1985.

VAIL, D.M.; KISSEBERTH, W.C.; OBRADOVICH, J.E. *et al.* Assessment of potential doubling time ( $T_{pot}$ ), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology*, New York, v.24, n.7, p.807-815, 1996.

VARASCHIN, M.S.; WOUTERS, F.; BERNINS, V.M.O. *et al.* Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais; formas de apresentação clínico-patológicas. *Clínica Veterinária*, São Paulo, v.6, n.32, p.332-338, 2001.



---

VERMOOTEN, M.I. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. **Journal South African Veterinary Association**, Pretoria, v.58, n.3, p.147-150, set. 1987.

VIDAL, B.C.; BARBISAN, L.F.; MARIA, S.S.; *et al.* Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, Springer, v.1, p.218-221, 1996.

VIDAL, B.C; MELLO, M.L. Re-evaluating the AgNOR staining response in Triton X-100-treated liver cells by image analysis. **Analytical Cellular Pathology**, v.9, p.39-43, 1995.

VIDAL, B.C.; PLANDING, W.; MELLO, M.L.; *et al.* Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v.7, p.27-41, 1994.

WELLMAN, M.L. The cytologic diagnosis of neoplasia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.20, n.4, p.919-938, jul. 1990.

WRIGHT, P.J.; PARRY, B.W. Cytology of the canine reproductive system. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.19, p.851-874, 1989.

YANG, T.J. Transmissible venereal neoplasia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, v.139, n.8, p.979-980, abr. 1981.

YANG, T. Regression of canine transmissible venereal sarcoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.191, n.1, p.06, jul. 1987.

YANG, T.J.; PALKER, T.J.; HARDING, M.W. Tumor size, leukocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with the canine transmissible venereal sarcoma. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, Heidelberg, v.33, n.4, p.255-262, 1991.

**Anexo 1** – Viabilidade celular (%) do tumor venéreo transmissível após incubação por 6, 24 e 48 horas, com diferentes concentrações de própolis (P) em cinco casos diferentes.

Período Tratamento	0 h	6 h	24 h	48 h	Tipo morfológico	Animal
<b>Controle</b>	72,82	84,91	76,12	52,01	Linfocitóide	11
	50,52	58,42	78,95	78,29	Misto	27
	44,74	83,81	89,40	81,48	Linfocitóide	28
	52,07	81,41	73,47	44,33	Plasmocitóide	23
	59,05	74,58	70,14	60,83	Plasmocitóide	29
<b>10 µg</b>	72,82	76,77	18,06	1,47	Linfocitóide	11
	50,52	0	0	0	Misto	27
	44,74	0	0	0	Linfocitóide	28
	52,07	75,15	9,39	9,45	Plasmocitóide	23
	59,05	44,38	32,36	4,41	Plasmocitóide	29
<b>25 µg</b>	72,82	52,24	1	0	Linfocitóide	11
	50,52	0	0	0	Misto	27
	44,74	0	0	0	Linfocitóide	28
	52,07	65,80	8,27	1,50	Plasmocitóide	23
	59,05	31,56	6,70	2,46	Plasmocitóide	29
<b>50 µg</b>	72,82	0,41	0	0	Linfocitóide	11
	50,52	0	0	0	Misto	27
	44,74	0	0	0	Linfocitóide	28
	52,07	45,54	2,25	0,82	Plasmocitóide	23
	59,05	3,69	2,59	1,43	Plasmocitóide	29
<b>100 µg</b>	72,82	0	0	-	Linfocitóide	11
	50,52	0	0	0	Misto	27
	44,74	0	0	0	Linfocitóide	28
	52,07	2,70	0	0	Plasmocitóide	23
	59,05	1,19	1,66	0	Plasmocitóide	29
<b>Álcool etílico</b>	-	-	-	-	Linfocitóide	11
	50,52*	2,79*	7,14*	24,47*	Misto	27
	44,74*	0,89*	6,21*	12,21*	Linfocitóide	28
	52,07	85,17	79,91	57,49	Plasmocitóide	23
	59,05	80,41	76,12	67,31	Plasmocitóide	29

\* Nesses ensaios, 20 µl de álcool etílico 70°G foram adicionados diretamente à cultura, sem prévia diluição no meio de cultura.

**Anexo 2** – Concentração celular ( $\times 10^6$  céls./mL) do tumor venéreo transmissível após 6, 24 e 48 horas de incubação com diferentes concentrações de própolis (P) em cinco casos diferentes.

Período Tratamento	0 h	6 h	24 h	48 h	Tipo morfológico	Animal
<b>Controle</b>	2,00	2,46	1,70	0,72	Linfocitóide	11
	2,00	2,07	1,80	1,23	Misto	27
	2,00	2,47	1,35	1,06	Linfocitóide	28
	2,00	2,92	2,33	1,38	Plasmocitóide	23
	2,00	2,68	1,30	1,37	Plasmocitóide	29
<b>10 µg</b>	2,00	2,50	0,48	0,04	Linfocitóide	11
	2,00	0	0	0	Misto	27
	2,00	0	0	0	Linfocitóide	28
	2,00	2,48	0,27	0,30	Plasmocitóide	23
	2,00	1,42	0,67	0,08	Plasmocitóide	29
<b>25 µg</b>	2,00	1,96	0,025	0	Linfocitóide	11
	2,00	0	0	0	Misto	27
	2,00	0	0	0	Linfocitóide	28
	2,00	1,85	0,23	0,05	Plasmocitóide	23
	2,00	0,99	0,17	0,07	Plasmocitóide	29
<b>50 µg</b>	2,00	0,01	0	0	Linfocitóide	11
	2,00	0	0	0	Misto	27
	2,00	0	0	0	Linfocitóide	28
	2,00	1,43	0,06	0,02	Plasmocitóide	23
	2,00	0,10	0,07	0,03	Plasmocitóide	29
<b>100 µg</b>	2,00	0	0	0	Linfocitóide	11
	2,00	0	0	0	Misto	27
	2,00	0	0	0	Linfocitóide	28
	2,00	0,09	0	0	Plasmocitóide	23
	2,00	0,03	0,05	0	Plasmocitóide	29
<b>Álcool etílico</b>	-	-	-	-	Linfocitóide	11
	2,00 <sup>†</sup>	0,08 <sup>†</sup>	0,15 <sup>†</sup>	0,46 <sup>†</sup>	Misto	27
	2,00 <sup>†</sup>	0,02 <sup>†</sup>	0,10 <sup>†</sup>	0,21 <sup>†</sup>	Linfocitóide	28
	2,00	1,95	1,83	1,42	Plasmocitóide	23
	2,00	1,74	1,29	0,98	Plasmocitóide	29

<sup>†</sup> Nesses ensaios, 20 µl de álcool etílico 70°G foram adicionados diretamente à cultura, sem prévia diluição no meio de cultura.

**Anexo 3 – Dados dos casos de TVT colhidos (continua).**

AMOSTRA	NÚM.	RAÇA	SEXO	IDADE	PADRÃO	TEMPO <sup>1</sup>	LOCALIZ.	COMPORT.	TAM.	MATERIAL
1S	1	SRD	M	6a 3m	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	30x7
2S	2	SRD	M	4a	Misto	1	Genital	Primário	P	13,5x4; 30x7
4S	3	SRD	M	5a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	30x7
5S	4	SRD	F	10a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	30x7
6S	5	Poodle	F	6a	Misto	2	Genital	Primário	P	30x7
7S-80	6	Boxer	F	5a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	M	30x7
80A					Misto	3	Extragenital	Não-primário	G	25x7
8S-78N	7	SRD	M	4a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	P	30x7
9S-76N	8	Boxer	F	2a 5m	Misto	2	Genital	Primário	P	30x7
10S-83	9	SRD	F	6a	Linfocitóide	3	Genital	Primário	M	Escova
11S-82	10	SRD	M	-	Linfocitóide	3	Genital	Primário	M	30x7
12S-84	11	SRD	M	9a	Misto	3	Genital	Primário	M	30x7
13S-85	12	SRD	F	10a	Misto	1	Genital	Primário	M	30x7
14S-86	13	SRD	F	14a	Linfocitóide	1	Genital	Primário	P	25x7
15S-87	14	SRD	M	6a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	25x7
16S	15	SRD	F	2a	Linfocitóide	2	Genital	Primário	P	Escova
17S-89	16	SRD	M	1a	Misto	1	Genital	Primário	P	25x7
89A					Misto	1	Extragenital	Não-primário	P	25x7
18S-81N	17	SRD	M	6a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	30x7
19S-90	18	P.A.	F	3a 6m	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	M	25x7
20S-91	19	SRD	F	3a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	P	25x7
21S-98	20	SRD	M	1a	Misto	2	Genital	Primário	G	25x7
22S	21	SRD	M	2a	Misto	2	Genital	Primário	M	Escova
23S-99	22	Dasch.	M	4a	Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	P	Biopsia
24S-100	23	SRD	M	3a	Misto	3	Genital	Primário	M	Biopsia
25S-101	24	SRD	M	-	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	Biopsia
26S-102	25	SRD	F	18a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	Biopsia
27S	26	SRD	F	2a	Misto	3	Genital	Primário	M	Biopsia
28S	27	SRD	F	6a	Linfocitóide	3	Genital	Primário	M	Biopsia
29S	28	SRD	F	4a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	Biopsia
30S	29	SRD	M	3a	Misto	3	Genital	Primário	M	Biopsia
01	30	SRD	M	10a	Linfocitóide	3	Genital	Primário	G	25x7

1 - tumores recentes (com até três semanas de evolução), 2 - estabelecidos (com três a oito semanas de evolução), 3 - antigos (com mais de oito semanas).

**Anexo 4 – Continuação dos dados dos casos de TVT colhidos.**

AMOSTRA	NÚM.	RAÇA	SEXO	IDADE	PADRÃO	TEMPO <sup>2</sup>	LOCALIZ.	COMPORT.	TAM.	MATERIAL
07	31	SRD	F	13a	Linfocitóide	-	Genital	Primário	P	25x7
18	32	SRD	F	2a	Linfocitóide	-	Genital	Primário	P	25x7
20	33	SRD	M	5a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	G	25x7
21	34	SRD	M	1a	Linfocitóide	3	Extragenital	Primário	M	25x7
23A	35	P. Belga	F	4a	Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	G	25x7
26	36	SRD	M	6a	Linfocitóide	2	Genital	Primário	M	25x7
30	37	SRD	F	3a	Misto	3	Genital	Primário	M	25x7
30A					Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	M	25x7
31	38	SRD	M	2a	Linfocitóide	2	Genital	Primário	M	25x7
32A	39	SRD	M	5a	Plasmocitóide	-	Extragenital	Não-primário	M	25x7
33A	40	P.A.	M	5a	Misto	3	Extragenital	Não-primário	P	25x7
35B	41	SRD	F	6a	Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	G	25x7
35C					Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	P	25x7
39	42	SRD	F	9a	Misto	2	Genital	Primário	M	25x7
42B	43	SRD	F	1a	Plasmocitóide	2	Extragenital	Não-primário	M	25x7
45	44	SRD	F	6a	Linfocitóide	-	Genital	Primário	G	25x7
47	45	SRD	M	2a	Plasmocitóide	1	Genital	Primário	G	25x7
49	46	Weimar.	M	4a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	25x7
50	47	SRD	F	6a	Misto	3	Genital	Primário	G	25x7
51	48	SRD	F	2a	Misto	3	Genital	Primário	P	25x7
53	49	SRD	M	7a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	G	25x7
54	50	SRD	M	2a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	M	25x7
55	51	SRD	M	5a	Misto	3	Extragenital	Primário	P	25x7
56	52	Fox Paul.	M	10a	Linfocitóide	3	Genital	Primário	M	25x7
57	53	SRD	M	10a	Linfocitóide	3	Genital	Recorrente	M	25x7
62	54	Poodle	F	4a	Linfocitóide	2	Genital	Primário	M	25x7
64	55	Cocker	M	4a	Linfocitóide	3	Extragenital	Primário	P	25x7
65	56	SRD	M	-	Linfocitóide	-	Genital	Primário	G	25x7
68	57	Poodle	M	2a	Plasmocitóide	1	Genital	Primário	P	25x7
75	58	SRD	F	7a	Misto	3	Genital	Primário	P	25x7
88	59	P.A.	F	3a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	25x7
92	60	SRD	M	11a	Plasmocitóide	2	Genital	Primário	P	25x7

1 - tumores recentes (com até três semanas de evolução), 2 - estabelecidos (com três a oito semanas de evolução), 3 - antigos (com mais de oito semanas).

**Anexo 5 – Continuação dos dados dos casos de TVT colhidos.**

AMOSTRA	NÚM.	RAÇA	SEXO	IDADE	PADRÃO	TEMPO <sup>3</sup>	LOCALIZ.	COMPORT.	TAM.	MATERIAL
93	<b>61</b>	SRD	M	-	Misto	2	Genital	Primário	M	25x7
93C					Misto	2	Extragenital	Não-primário	P	25x7
94	<b>62</b>	Sheepd.	F	-	Linfocitóide	1	Genital	Primário	P	25x7
95A	<b>63</b>	SRD	M	-	Misto	-	Extragenital	Não-primário	G	25x7
96A	<b>64</b>	Boxer	F	4a	Linfocitóide	3	Extragenital	Não-primário	P	25x7
96B					Linfocitóide	3	Extragenital	Não-primário	P	25x7
103	<b>65</b>	SRD	M	4a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	25x7
104	<b>66</b>	SRD	M	4a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	G	25x7
104A					Plasmocitóide	3	Extragenital	Não-primário	M	25x7
104B					Plasmocitóide	2	Extragenital	Não-primário	P	25x7
104C					Plasmocitóide	2	Extragenital	Não-primário	P	25x7
105	<b>67</b>	SRD	F	2a	Misto	3	Genital	Primário	M	25x7
105A					Misto	2	Extragenital	Não-primário	M	25x7
105B					Misto	3	Extragenital	Não-primário	G	25x7
106	<b>68</b>	SRD	F	4a	Plasmocitóide	3	Genital	Recorrente	G	25x7
106R					Plasmocitóide	3	Genital	Recorrente	G	25x7
107	<b>69</b>	SRD	F	-	Plasmocitóide	-	Genital	Primário	M	25x7
108	<b>70</b>	Pointer	F	3a	Plasmocitóide	3	Genital	Primário	P	25x7
109	<b>71</b>	SRD	F	-	Linfocitóide	-	Genital	Primário	M	25x7
109A					Misto	-	Extragenital	Não-primário	P	25x7
109B					Misto	-	Extragenital	Não-primário	P	25x7
110	<b>72</b>	SRD	F	1a	Plasmocitóide	-	Genital	Primário	G	25x7
110A					Plasmocitóide	-	Extragenital	Não-primário	G	25x7
112	<b>73</b>	SRD	F	-	Misto	3	Genital	Primário	MM	25x7
113	<b>74</b>	SRD	M	-	Misto	3	Genital	Primário	M	25x7
114	<b>75</b>	Poodle	M	-	Plasmocitóide	-	Genital	Primário	P	25x7
117A	<b>76</b>	SRD	M	6a	Plasmocitóide	1	Extragenital	Não-primário	G	25x7
119	<b>77</b>	SRD	F	-	Plasmocitóide	-	Genital	Primário	G	25x7

1 - tumores recentes (com até três semanas de evolução), 2 - estabelecidos (com três a oito semanas de evolução), 3 - antigos (com mais de oito semanas).

## **Anexo 6 – Técnica de coloração pela prata para NOR (AgNOR)**

### Preparo das soluções:

- Solução A:

1g de gelatina incolor em 50 mL de água deionizada

0,5 mL de ácido fórmico para correção

- Solução B:

50g nitrato de prata em 100 mL de água deionizada

- Solução de uso: Duas partes da solução B para uma parte de solução A (só misturar na hora do uso).

- Triton X 0,5%:

0,5 mL de Triton-X 100 em 99,5 mL de PBS

### Procedimento:

- Retirar as lâminas de citologia do álcool 95°GL

- Deixar as lâminas imersas em álcool 70°GL por 10 minutos

- Desprezar o álcool 70°GL e imergir as lâminas em álcool 50°GL por 10 minutos

- Desprezar o álcool 50°GL e deixar as lâminas imersas em água deionizada por 15 minutos

- Desprezar a água e imergir as lâminas na solução de Triton-X 100 por 15 minutos

- Lavar em água corrente por cinco minutos e hidratar em água deionizada por 5 minutos

- Colocar a solução de uso (mistura das soluções A e B) na bandeja de polipropileno e colocar as lâminas por cima com a face virada para baixo, em contato com a solução

- Levá-las para a estufa a 37°C por 15 minutos ao abrigo da luz, até que a solução se revele e torne-se marrom escura

- Retirar rapidamente as lâminas da estufa e lavar em água corrente para interromper a reação, esperar secar ao ar e montar com resina e lamínula.

### **Anexo 7 – Técnica de coloração pelo azul de toluidina para CEC**

#### Preparo das soluções:

- Solução de Cloreto de Magnésio a 0,05M:

5,08g de ClMg em 500 mL de água destilada

0,5 mL de ácido fórmico para correção

- Solução de azul de toluidina 0,025%:

25mg de azul de toluidina em 100 mL de tampão McIlvane

- Tampão McIlvane a pH 4,0:

Misturar 38,5 mL da solução fosfato (0,2M) com 61,5 mL da solução de ácido cítrico (0,1M).

#### Procedimento:

- Retirar as lâminas de citologia do álcool metílico (metanol)

- Lavar as lâminas em água destilada

- Deixar as lâminas imersas em água destilada por 10 minutos

- Desprezar a água e imergir as lâminas na solução de azul de toluidina por 25-30 minutos

- Lavar em água corrente e imergir as lâminas na solução de Cloreto de Magnésio por 5 a 15 minutos

- Lavar as lâminas em água corrente para interromper a reação

- Esperar secar ao ar e montar com resina e lamínula.

OBS: Caso a coloração tenha ficado pálida (sem contraste do nucléolo), desmontar as lâminas em xilol e proceder novamente os passos acima, porém, aumentando o tempo de imersão no corante e diminuindo o tempo na solução de Cloreto.



**Anexo 8** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo I (linfocitóide) (continua)

<b>CASO</b>	<b>21</b>	<b>26</b>	<b>31</b>	<b>64</b>	<b>65</b>	<b>109</b>	<b>57</b>	<b>S16</b>	<b>S28</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>18</b>
Área média dos pontos (nucléolo)	0,34	1,17	0,42	0,61	1,27	3,88	2,39	1,75	1,42	0,68	0,64	1,64
Área média dos pontos (núcleo)	0,15	0,32	0,00	0,19	0,21	0,19	0,26	0,29	0,28	0,26	0,28	0,29
Área média dos pontos (total)	0,33	0,43	0,42	0,33	0,78	1,25	0,51	0,76	0,39	0,52	0,45	0,51
Área média AgNOR / nucléolo	1,18	1,41	0,73	1,07	1,53	4,40	3,09	5,08	2,13	1,01	1,81	2,01
Área média AgNOR / núcleo	0,03	2,81	0,00	0,86	0,29	0,54	2,93	1,78	4,21	1,99	0,88	2,33
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	1,21	4,29	0,73	1,93	2,32	4,94	6,44	6,86	6,34	3,50	2,87	5,00
Nº médio pontos / nucléolo	3,50	1,27	1,72	1,77	1,20	1,13	1,29	2,90	1,50	1,52	2,76	1,23
Nº médio pontos / núcleo	0,20	8,80	0,00	4,57	1,37	2,83	11,17	6,13	14,83	7,57	3,20	8,13
nº médio pontos / célula	3,70	10,06	2,23	6,33	2,96	3,96	12,63	9,03	16,33	9,80	6,33	9,77
Localização	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>

P = primário

NP = metástase ou recorrente

**Anexo 9** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo I (linfocitóide) (continuação)

<b>CASO</b>	<b>45</b>	<b>56</b>	<b>62</b>	<b>82</b>	<b>83</b>	<b>94</b>	<b>96A</b>	<b>96B</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
Área média dos pontos (nucléolo)	1,11	0,56	0,61	0,84	1,43	1,41	0,72	0,91	1,19	0,82
Área média dos pontos (núcleo)	0,30	0,20	0,32	0,00	0,35	0,39	0,19	0,25	0,24	0,10
Área média dos pontos (total)	0,54	0,33	0,39	0,84	0,62	0,66	0,37	0,38	0,54	0,23
Área média AgNOR / nucléolo	1,90	1,06	1,18	1,25	1,60	1,74	1,39	1,95,3	1,87	1,14
Área média AgNOR / núcleo	1,38	0,68	1,76	0,00	1,20	1,36	0,66	2,04	1,39	1,11
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	3,60	1,74	2,94	1,25	2,82	3,10	2,05	3,99	3,40	1,80
Nº médio pontos / nucléolo	1,71	1,90	1,93	1,48	1,21	1,23	1,90	2,13	1,76	0,64
Nº médio pontos / núcleo	4,63	3,40	5,53	0,00	3,44	3,47	3,53	8,30	5,06	3,85
nº médio pontos / célula	6,63	5,30	7,47	1,48	4,58	4,70	5,43	10,43	6,96	3,75
Localização	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>		

P = primário

NP = metástase ou recorrente

**Anexo 10** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo II (plasmocitóide) (continua)

CASO	S29	20	23A	30A	32A	35B	35C	42B	47	49	53	54	68	88	92	103
Área média dos pontos (nucléolo)	1,46	1,52	0,74	0,88	1,57	1,60	1,08	0,86	1,11	1,40	1,75	2,42	1,11	0,63	0,48	5,21
Área média dos pontos (núcleo)	0,15	0,21	0,23	0,21	0,30	0,24	0,16	0,15	0,31	0,16	0,21	0,28	0,18	0,18	0,22	0,19
Área média dos pontos (total)	1,05	0,67	0,35	0,54	0,50	0,44	0,37	0,49	0,40	0,55	0,62	0,45	0,47	0,60	0,47	1,18
Área média AgNOR / nucléolo	2,97	1,87	1,09	1,26	1,83	1,86	1,48	1,23	1,45	2,00	2,11	2,42	1,63	1,08	0,90	5,73
Área média AgNOR / núcleo	0,15	0,48	1,18	0,43	1,89	1,70	0,72	0,23	3,01	0,51	0,68	3,08	0,59	0,02	0,01	1,19
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	3,42	2,35	2,27	2,19	3,72	3,56	2,20	1,46	4,46	2,51	2,79	5,50	2,22	1,24	0,91	9,32
nº médio pontos / nucléolo	2,03	1,23	1,52	1,43	1,20	1,17	1,37	1,43	1,30	1,43	1,20	1,00	1,47	1,72	1,88	1,56
Nº médio pontos / núcleo	1,03	2,27	5,07	2,03	6,23	7,00	4,57	1,57	9,80	3,10	3,27	11,10	3,20	0,10	0,06	6,34
Nº médio pontos / célula	3,27	3,50	6,53	4,03	7,43	8,17	5,93	3,00	11,10	4,53	4,47	12,10	4,67	2,06	1,94	7,90
Localização	P	P	NP	NP	NP	NP	NP	NP	P	P	P	P	P	P	P	P

P = primário

NP = metástase ou recorrente

**Anexo 11** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo II (plasmocitóide) (continuação)

CASO	104A	104B	104C	106	106R	107	108	110	110A	114	117A	119	Média	DP
Área média dos pontos (nucléolo)	2,93	2,91	2,86	2,21	0,72	1,39	2,43	1,73	1,48	1,60	1,17	1,26	1,66	0,98
Área média dos pontos (núcleo)	0,21	0,21	0,21	0,19	0,19	0,18	0,21	0,19	0,19	0,29	0,14	0,20	0,28	0,40
Área média dos pontos (total)	0,71	1,28	0,56	0,60	0,47	0,61	0,68	0,53	0,52	0,58	0,47	0,52	0,69	0,56
Área média AgNOR / nucléolo	4,20	4,19	3,24	2,90	1,21	1,21	3,52	2,49	2,55	1,86	1,40	1,80	2,20	1,14
Área média AgNOR / núcleo	1,35	0,46	1,57	0,96	0,28	0,28	1,19	0,96	0,96	1,45	0,34	1,49	0,97	0,79
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	5,55	4,65	4,81	3,86	1,49	1,49	4,83	3,45	3,56	3,74	1,75	5,32	3,38	1,80
nº médio pontos / nucléolo	1,43	1,44	1,13	1,34	1,72	1,72	1,45	1,44	1,73	1,16	1,20	1,42	1,43	0,24
nº médio pontos / núcleo	6,33	2,18	7,40	5,10	1,48	1,48	5,57	5,06	5,08	5,03	2,50	7,27	4,33	2,78
nº médio pontos / célula	7,77	3,62	8,53	6,45	3,21	3,21	7,07	6,50	6,84	6,47	3,70	10,30	5,87	2,69
Localização	NP	NP	NP	P	NP	P	P	P	NP	P	NP	P		

P = primário

NP = metástase ou recorrente

**Anexo 12** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo III (misto) (continua)

CASO	100	105	105A	105B	109A	109B	112	113	S27	S30	30
Área média dos pontos (nucléolo)	1,06	0,94	1,44	2,64	3,84	4,01	1,78	2,21	0,77	2,61	0,88
Área média dos pontos (núcleo)	0,22	0,30	0,18	0,21	0,19	0,23	0,22	0,21	0,18	0,23	0,21
Área média dos pontos (total)	0,45	0,92	0,40	0,69	0,60	0,75	0,41	0,76	0,55	0,48	0,54
Área média AgNOR / nucléolo	1,67	1,59	2,19	4,05	3,92	4,09	2,08	2,32	1,11	3,21	1,29
Área média AgNOR / núcleo	0,90	0,01	1,31	1,48	1,57	1,43	1,82	0,87	0,22	2,30	0,43
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	2,57	2,67	3,49	5,53	5,48	5,52	3,89	4,04	1,73	5,51	2,19
nº médio pontos / nucléolo	1,57	2,83	1,52	1,53	1,02	1,02	1,17	1,07	1,40	1,23	1,36
nº médio pontos / núcleo	4,17	0,07	7,18	7,17	8,18	6,26	8,43	4,23	1,20	10,17	2,03
nº médio pontos / célula	9,06	1,74	8,70	8,70	9,20	7,28	9,60	5,70	3,17	11,40	4,03
Localização	P	P	NP	NP	NP	NP	P	P	P	P	P

P = primário

NP = metástase ou recorrente

**Anexo 13** – Dados das medidas realizadas pela técnica de AgNOR nos TVTs do Grupo III (misto) (continuação)

CASO	33A	39	50	51	55	80A	84	93	93C	95A	98	Média	DP
Área média dos pontos (nucléolo)	1,87	0,63	0,70	0,74	1,41	0,74	0,69	0,63	0,49	0,68	0,37	1,41	1,05
Área média dos pontos (núcleo)	0,25	0,17	0,20	0,21	0,22	0,00	0,27	0,26	0,10	0,12	0,21	0,20	0,06
Área média dos pontos (total)	0,50	0,50	0,48	0,30	0,54	0,74	0,61	0,51	0,48	0,66	0,25	0,55	0,16
Área média AgNOR / nucléolo	2,28	1,23	1,24	1,32	2,04	1,24	1,09	0,89	0,77	1,04	0,66	1,88	1,06
Área média AgNOR / núcleo	1,76	0,15	0,46	1,81	0,88	0,00	0,04	0,18	0,00	0,01	1,23	0,86	0,74
Área média AgNOR / núcleo+nucléolo	4,19	1,57	2,40	3,11	2,98	1,24	1,13	1,07	0,78	1,07	1,89	2,91	1,60
nº médio pontos / nucléolo	1,26	1,97	1,84	1,80	1,45	1,67	1,58	1,40	1,58	1,54	1,77	1,53	0,39
nº médio pontos / núcleo	7,10	1,17	2,27	8,80	4,00	0,00	0,26	0,70	0,02	0,05	5,93	4,06	3,43
nº médio pontos / célula	8,40	3,13	5,03	10,60	5,50	1,67	1,84	2,10	1,60	1,62	7,70	5,81	3,35
Localização	NP	P	P	P	P	NP	P	P	NP	NP	P		

P = primário

NP = metástase ou recorrente

## Anexo 14 – Dados das medidas realizadas pela técnica de CEC nos TVTs do Grupo I (Linfocitóide)

Linfocitóide												
Caso	Área Nucléolo	Área Núcleo	Relação Nu:N	IndCirc Núcleo	IndCirc Nucléolo	Diâmetro Nucléolo	Diâmetro Núcleo	Eixo maior Nucléolo	EixoMenor Nucléolo	EixoMaior Núcleo	EixoMenor Núcleo	n médio nucléolos
<b>S10</b>	5,8910891	76,9703	0,075966	0,961089	0,9201			3,087129	2,39802	10,1505	8,70495	1
<b>S11</b>	5,7524752	74,28713	0,009703	0,962475	0,93901			2,982178	2,44158	9,87525	8,635644	1
<b>S16</b>	5,2574257	81,0495	0,066005	0,965149	0,93564			2,946535	2,3604	10,4218	9,025743	1
<b>S28</b>	5,4579592	83,77469	0,066282	0,964694	0,92653	2,61102	10,2696	3,232653	2,32796	11,2665	9,672041	1
<b>1</b>	4,4616	82,332	0,05449	0,9762	0,87774	2,571	10,2164	3,424	2,2338	11,1756	9,6746	1,24
<b>7</b>	5,0107692	79,31923	0,06249	0,971538	0,89865	2,47404	10,0067	3,178846	2,19635	11,0587	9,407115	1
<b>18</b>	3,1476923	64,78462	0,049075	0,974808	0,90154	2,2125	9,05404	2,904615	1,93962	9,9925	8,525962	1,25
<b>21</b>	3,9288	66,7632	0,05975	0,9736	0,9024	2,2082	9,1864	2,801	1,9916	10,174	8,6362	1
<b>26</b>	3,9862295	70,12	0,05579	0,974098	0,92016	2,2323	9,41754	2,504754	3,42738	10,3792	8,884098	1
<b>31</b>	2,92	53,6014	0,054949	0,978246	0,92281	2,01965	8,2386	2,574035	1,80368	9,12193	7,762807	1,12281
<b>45</b>	4,4103704	90,94	0,048902	0,972222	0,91323	2,51019	10,6861	3,193704	2,26481	11,8856	9,967778	1,14815
<b>56</b>	2,6022222	0,877037	0,051267	0,977963	0,9313	1,83963	8,05241	2,401852	1,59333	8,96463	7,573333	1,03704
<b>57</b>	3,3082353	60,19765	0,056096	0,999804	0,90464	2,35451	8,80529	3,075098	2,09039	9,72314	8,274706	1,35294
<b>62</b>	2,92	55,2984	0,04566	0,9756	0,9206	1,782	8,3762	2,3034	1,579	9,265	7,908	1
<b>64</b>	3,0885714	55,46642	0,05959	0,980189	0,89696	1,96268	8,3683	2,54125	1,76821	9,24	7,867547	1,0566
<b>65</b>	2,3205634	55,73098	0,058871	0,974314	0,91761	1,67408	8,37667	2,181549	1,45239	9,34863	7,818431	1,39216
<b>94</b>	3,3176	59,676	0,055824	0,973	0,948	2,0378	8,6802	2,5364	1,8048	9,7122	8,0448	1
<b>96a</b>	2,6128302	56,46566	0,047088	0,981698	0,91415	1,81283	8,45472	2,331509	1,60038	9,3434	7,936981	1
<b>96b</b>	3,6945455	72,42231	0,054765	0,9775	0,93164	2,12436	9,52	2,704545	1,89436	10,5842	8,904615	1,05769

<b>109</b>	3,908	72,04	0,053345	0,9726	0,9382	2,1938	9,5236	2,7352	1,9876	10,4488	9,0088	1
	3,89984893	65,60582	0,054295	0,974339	0,918045	2,154152	9,131341	2,7820127	2,057783	10,106575	8,6117076	1,082869

Anexo 15 – Dados das medidas realizadas pela técnica de CEC nos TVTs do Grupo II (plasmocitóide) (continua)

Plasmocitóide												
Caso	Área Nucléolo	Área Núcleo	Relação Nu:N	Ind Circ Núcleo	Ind Circ Nucléolo	Diâmetro Nucléolo	Diâmetro Núcleo	Eixo maior Nucléolo	Eixo Menor Nucléolo	Eixo Maior Núcleo	Eixo Menor Núcleo	n médio nucléolos
S01	5,81967	71,7213	0,08163	0,94868	0,92678			3,662295	3,036066	9,977049	8,196721	1,44262
S04	4,58651	66,71685	0,070427	0,954831	0,938644			3,207416	2,425618	9,92618	8,18427	1,34831
S07	4,4064	67,7104	0,065582	0,9686	0,9164	2,3466	9,253	3,0086	2,0432	10,2352	8,7126	1
S20	3,88118	70,7920	0,05521	0,96752	0,94524			2,479208	1,974257	9,70297	8,613861	1
S23	9,92145	127,477	0,08203	0,97236	0,88833	3,82454	12,6318	4,85	3,483273	13,85618	11,89655	1,30909
S25	9,16603	103,929	0,08907	0,96830	0,91603	3,37132	11,4439	4,136792	3,063774	12,57321	10,80264	1
S29	8,64627	98,8666	0,08861	0,97058	0,94313	3,29058	11,1868	3,987843	3,008235	12,29059	10,51431	1
20	3,96	73,8596	0,0537	0,97549	0,93254	2,22156	9,67196	2,813333	1,946078	10,66941	9,127843	1
23a	2,63294	48,4102	0,05499	0,97725	0,96686	1,86941	7,82647	2,398824	1,668235	8,730392	7,242157	1,05882
30a	3,636	60,9344	0,06029	0,971	0,91063	2,3508	8,7724	3,0402	2,0866	9,854	8,1668	1,26
32a	2,64	65,3688	0,04107	0,97236	0,9438	1,8256	9,0894	2,2762	1,6502	10,0914	8,563	1
35b	3,38296	72,4118	0,04668	0,975	0,92388	2,05574	9,55666	2,58537	1,85	10,51722	9,00037	1
35c	3,19384	57,6492	0,05392	0,97269	0,89288	1,97134	8,53846	2,559423	1,728077	9,534615	8,023077	1
42b	2,96313	59,6109	0,05074	0,97666	0,93705	1,93117	8,67980	2,420784	1,722549	9,597451	8,171961	1
47	3,736	73,092	0,05120	0,9734	0,94	2,1504	9,618	2,6636	1,9528	10,6612	8,9778	1
49	3,39538	55,1430	0,06358	0,97615	0,92557	2,05730	8,3275	2,587115	1,849423	9,2075	7,805577	1
53	4,05960	67,4925	0,06019	0,97803	0,90509	2,23333	9,22156	2,836078	2,005882	10,15922	8,697647	1
54	3,51372	71,4925	0,04922	0,97882	0,95058	2,10254	9,52196	2,602549	1,908627	10,32275	9,102549	1
68	4,72290	56,2189	0,08307	0,97945	0,89418	2,42236	8,41581	3,158	2,140545	9,385455	7,868	1,01818
88	3,23918	59,7232	0,05469	0,97632	0,92873	2,25918	8,68734	2,904898	1,960204	9,590612	8,201837	1,28571



92	3,66196	79,2752	0,04681	0,97156	0,92431	2,13529	10	2,665686	1,948235	11,02392	9,411373	1
----	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----	----------	----------	----------	----------	---

(Continua)

**Anexo 16** – Dados das medidas realizadas pela técnica de CEC nos TVTs do Grupo II (plasmocitóide) (continuação)

<b>Plasmocitóide</b>												
<b>Caso</b>	Área Nucléolo	Área Núcleo	Relação Nu:N	Ind Circ Núcleo	Ind Circ Nucléolo	Diâmetro Nucléolo	Diâmetro Núcleo	Eixo Maior Nucléolo	Eixo Menor Nucléolo	Eixo Maior Núcleo	Eixo Menor Núcleo	<i>n</i> médio nucléolos
103	4,24627	88,100	0,04819	0,97254	0,92605	2,67627	10,5617	3,38902	2,376078	11,63216	9,933137	1,392157
104	3,2448	59,828	0,05528	0,979	0,9144	2,0024	8,6718	2,5674	1,7644	9,6694	8,0528	1
104a	3,6909	65,358	0,05700	0,98196	0,92666	2,16019	9,09254	2,737843	1,958431	10,00824	8,52902	1,019608
104b	4,44642	76,345	0,05720	0,97607	0,91892	2,32446	9,8175	2,932857	2,080714	10,84589	9,191071	1
104c	5,94588	98,282	0,06063	0,96862	0,93862	2,72176	11,1343	3,386863	2,423922	12,34176	10,44196	1
106	3,3728	73,48	0,04620	0,9648	0,9326	2,0564	9,6454	2,5986	1,8498	10,6596	9,0894	1
106R	3,30666	62,285	0,05384	0,98037	0,94444	2,05388	8,87388	2,624444	1,828333	9,782963	8,380556	1,018519
107	3,852	61,780	0,06293	0,9762	0,91339	2,318	8,8498	2,9994	2,0222	9,8254	8,2924	1,12
108	3,56754	55,984	0,06527	0,97717	0,91547	2,11377	8,38792	2,716792	1,878679	9,312075	7,889623	1
110	3,1024	66,299	0,04757	0,9762	0,935	1,9768	9,155	2,4806	1,744	10,01	8,6788	1
110a	3,44235	62,507	0,05437	0,97843	0,90882	2,05235	8,85176	2,692549	1,780588	9,725882	8,342941	1
114	2,8616	61,067	0,04204	0,974	0,91719	2,0178	8,7778	2,5362	1,846	9,8042	8,2012	1,14
117a	4,92074	78,026	0,06707	0,97777	0,966	2,6526	10,6766	3,3996	2,373	11,7974	9,9796	1,08
119	7,43214	101,85	0,12051	0,96875	0,91469	4,28107	11,2682	5,503036	3,792679	12,51518	10,55357	2,053571
	4,35993	71,974	0,06117	0,97305	0,92637	2,37033	9,51465	3,011698	2,147734	10,45248	8,881058	1,101332

**Anexo 17** – Dados das medidas realizadas pela técnica de CEC nos TVTs do Grupo III (misto)

Caso	Área Nucléolo	Área Núcleo	Relação Nu:N	Ind Circ Núcleo	Ind Circ Nucléolo	Diâmetro Nucléolo	Diâmetro Núcleo	Eixo Maior Nucléolo	Eixo Menor Nucléolo	Eixo Maior Núcleo	Eixo Menor Núcleo	n médio nucléolos
S12	4,31683	69,0693	0,06345	0,95436	0,9198			2,65149	2,08713	9,73069	8,33663	1
S13	5,96296	99,6234	0,08259	0,9539	0,91241			3,25926	2,47593	11,3455	9,93247	1,4026
S21	8,26733	107,277	0,07843	0,96911	0,93436			3,59208	2,86337	11,7584	10,4218	1
S22	7,56571	98,5675	0,08702	0,96104	0,90464	2,94089	11,0927	3,66482	2,69911	12,1623	10,5158	1,16667
S24	10,284	113,283	0,09163	0,9694	0,9146	3,58	11,9576	4,44	3,2118	13,1286	11,2696	1
S27	3,60542	75,0785	0,0542	0,97712	0,92	2,09508	9,74288	2,66288	1,87847	10,6	9,31135	1,13462
S30	3,9488	83,524	0,04742	0,9728	0,9218	2,2212	10,2884	2,7868	2,0072	11,4138	9,6484	1
30	2,52067	57,728	0,0529	0,9798	0,91317	1,77367	8,5452	2,284	1,5785	9,4572	8,015	1,2
33a	2,84706	62,0149	0,04629	0,97941	0,91373	1,89569	8,86451	4,53333	3,65137	7,60627	6,42373	1
39	3,448	55,888	0,06211	0,9812	0,9302	2,0796	8,3934	2,6408	1,8306	9,219	7,9778	1
50	2,72308	61,2784	0,05698	0,97765	0,92138	1,834	8,80843	2,33308	1,64031	9,7351	8,29667	1,27451
51	4,28462	71,5292	0,06003	0,97635	0,94308	2,31192	9,5125	2,88615	2,06481	10,3979	9,035	1
55	3,64941	66,9012	0,05468	0,97922	0,92608	2,1351	9,20627	2,69118	1,89667	10,0722	8,6751	1
75	3,0064	58,0984	0,0522	0,9772	0,9452	1,9406	8,5804	2,4392	1,733	9,465	8,1152	1
80a	3,13434	60,3532	0,05295	0,97472	0,90415	1,98358	8,73453	2,54472	1,80226	9,77151	8,18604	1
93	4,66308	67,6654	0,06877	0,97423	0,9225	2,40212	9,21481	3,015	2,14327	10,2313	8,65404	1
93c	2,49585	53,7494	0,04665	0,98019	0,90906	1,77226	8,25302	2,30396	1,57925	9,12321	7,73811	1
95a	2,63529	58,6149	0,04537	0,9749	0,93725	1,81706	8,60667	2,28059	1,64431	9,47255	8,16333	1
105	3,34036	74,3775	0,04511	0,97691	0,89327	2,03418	9,67691	2,64927	1,81073	10,6444	9,07127	1
105a	2,97333	75,8902	0,03919	0,9749	0,93059	1,93294	9,81314	2,45412	1,69941	10,8102	9,22451	1
105b	3,7851	83,3365	0,04523	0,97686	0,91059	2,17235	10,2651	2,74373	1,93784	11,2357	9,75275	1

BASSANI-SILVA, S.

Anexos

<b>109a</b>	4,3128	72,5136	0,05956	0,971	0,9414	2,322	9,5756	2,8546	2,111	10,5798	8,9384	1
<b>109b</b>	4,44627	74,2973	0,05888	0,97059	0,95196	2,3349	9,65608	2,84118	2,14353	10,6324	9,09078	1
<b>112</b>	2,94717	64,2554	0,04769	0,97981	0,92887	1,92868	9,01269	2,46434	1,71	10,0067	8,43442	1,01923
<b>113</b>	3,95172	69,0698	0,06387	0,97843	0,93103	2,16328	9,30471	2,70483	1,94914	10,322	8,68569	1,13725
	4,20462	73,3594	0,05853	0,97364	0,92324	2,16687	9,41389	2,86886	2,08596	10,3569	8,87656	1,05339

**Anexo 18** – Detalhamento dos procedimentos realizados até a padronização da cultura células de TVT com própolis.

Para a cultura celular, foram utilizadas células de TVT colhidas da mesma maneira que para preparações citológicas. As agulhas foram “lavadas” em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 completo (meio RPMI acrescido de 5 % de soro bovino fetal e 2mM de glutamina) com DMSO previamente distribuídos em criotubos, e congeladas imediatamente em freezer -80°C. Após 12-24 h, o material congelado foi transferido para armazenamento em botijão de nitrogênio líquido até seu processamento para cultura.

As primeiras 15 amostras foram congeladas em meio RPMI 1640 completo com 20% de DMSO. Visto que a viabilidade celular de 7 amostras descongeladas, avaliada pelo método de exclusão em azul de Tripán, estava baixa após o descongelamento (variando de 42,16% a 66,67%), outras 5 amostras foram congeladas somente com 10% de DMSO, para verificar a viabilidade celular após o descongelamento. A porcentagem de células viáveis aumentou para 68,19% a 90%.

No início da padronização da cultura celular, utilizando-se amostra descongelada (Caso 4), tentou-se a separação das células tumorais com Ficoll® para eliminar as células contaminantes. Porém, após o processamento, verificou-se ausência de células. Isso se deu provavelmente devido à densidade do Ficoll® não ser a ideal ou por má coleta das células entre o Ficoll® e o meio de cultura, uma vez que esse anel celular não estava visível.

Descongelou-se, então, outra amostra (Caso 1), procedeu-se a lavagem celular (em tubo Falcon®) para retirada do meio de congelamento (meio RPMI com DMSO) e realizou-se a contagem e a viabilidade celular da mesma. A viabilidade celular foi de 58,82% e havia  $2,4 \times 10^6$  células em 1,2 mL. Mesmo com a viabilidade baixa, foi realizada a cultura celular, com todo o conteúdo aspirado pela citologia (sem separar as células tumorais). As células tumorais foram colocadas em meio completo e foram distribuídos 100  $\mu$ l contendo  $2 \times 10^5$  células em cada poço da placa de microcultura, seguido de

incubação a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, verificando-se a viabilidade e concentração celular após 24, 48 e 72 h de incubação.

Após 24 h, a viabilidade foi de 80,73% e havia 1,98x10<sup>6</sup> células/mL. Com 48 h, os resultados foram de 73,29% de viabilidade e 1,47x10<sup>6</sup> células/mL. Já com 72 h, notou-se diminuição da viabilidade celular, pois os resultados foram de 66,58% e 1,13x10<sup>6</sup> células/mL. Analisando esses dados preliminares de padronização, foi suposto que esse "sofrimento" celular seria devido à falta de nutrientes e, deste modo, adicionaram-se 100 µl de meio completo a cada poço restante para verificar a viabilidade e a concentração celular. Após 96 h de incubação (e 24 h após suplementação), verificou-se 56,40% de viabilidade. Foi avaliada a hipótese de que as células provavelmente não cresceram devido ao consumo rápido de nutrientes nas primeiras 24 h, faltando, conseqüentemente, nutrientes nas horas seguintes.

Dando continuidade, nova amostra foi trabalhada (Caso 5) e a lavagem das células foi realizada em tubo de vidro. A viabilidade celular foi de 66,67%, porém, a concentração celular obtida foi muito baixa, conseguindo-se apenas células para três poços (2x10<sup>5</sup> células/poço). A placa de cultura foi incubada a 37°C e realizou-se contagem e viabilidade celular após 24 h. Os resultados foram de 69,45% de viabilidade e 7,34x10<sup>4</sup> células/poço.

A amostra do caso 7 foi também descongelada e processada da mesma maneira que a do caso 5. Novamente verificou-se baixa concentração celular e a viabilidade celular foi de 60%. A placa foi incubada e a viabilidade verificada em três momentos após incubação: 4, 8 e 24 h. Descartou-se esse material, pois havia apenas células inviáveis nos três momentos consecutivos.

Atribuiu-se a baixa celularidade dos casos 5 e 7 provavelmente ao processamento dessas amostras em tubo de vidro, ao invés de tubo de plástico (tubo Falcon®).

Uma nova amostra foi descongelada (Caso 9) e retornou-se à utilização de tubo plástico (tubo Falcon®) para evitar aderência das células no vidro durante processo de lavagem das mesmas. A viabilidade celular foi de 57,59% e a concentração celular foi de 3,1x10<sup>5</sup> células/mL. Tentou-se então

expandir as células em garrafas para cultura de 200 ml. Às células tumorais foram acrescentados 15 mL de meio de cultura completo, para que as células tumorais não morressem por falta de nutrientes, os quais foram transferidos para a garrafa de cultura. A garrafa foi incubada em estufa de cultura celular e realizou-se contagem celular e viabilidade após 24 e 48 h. Com 24 h não foi possível realizar a contagem celular nem a viabilidade celular devido à ausência de células; o meio de cultura foi trocado e incubou-se novamente. Após 48 h da primeira incubação, verificou-se que a viabilidade celular havia diminuído (50%). Decidiu-se então eliminar a amostra para não gastar material com células que estavam perdendo a viabilidade, quando deveriam aumentar, ou pelo menos manterem-se estáveis.

Outra amostra (Caso 16) foi então processada para nova tentativa de expansão celular. A viabilidade foi de 68,19% e a concentração de  $3,06 \times 10^6$  células/ml. As células foram suspensas novamente em um total de 15 mL, que foram transferidos para a garrafa de cultura celular e incubados a  $37^\circ\text{C}$ . Após 24 h, a viabilidade foi de 94,29% e a concentração de  $4,95 \times 10^6$  células/mL. Observando a garrafa de cultura no microscópio invertido, verificava-se grande quantidade de células que não haviam se desprendido da parede, o que nos levou a acreditar que o número de células seria maior que o da contagem inicial. Trocou-se o meio de cultura e retornou-se a garrafa à estufa. Após 48 h, a viabilidade celular era próxima de 100% e a concentração de  $3,6 \times 10^6$  células/mL. Observou-se então uma ligeira queda na concentração celular, mas talvez devido à aderência das células na parede da garrafa. Com 72 h, realizou-se lavagem da parede da garrafa com tripsina, para desprender as células da parede. A viabilidade e a concentração celular, após a lavagem com tripsina (tóxica para células), foi de 96,44% e  $1,63 \times 10^6$  células/mL, respectivamente (mesmo com a tentativa de desprendimento das células o número das mesmas reduziu). Novo meio de cultura foi adicionado para observação após 96 horas de incubação. A viabilidade celular elevou-se novamente (97,98%), porém, o número celular foi de  $0,97 \times 10^6$  células/mL. Em vez de 15 mL de meio de cultura com 10% de soro bovino fetal foram colocados 20 mL de meio de cultura com 15% de soro bovino fetal a fim de

que as células pudessem retomar seu crescimento. Após 168 h de incubação, a viabilidade celular foi de 99%, porém, a concentração celular diminuiu para  $7,4 \times 10^5$  células/mL. Descartou-se a amostra, apesar da boa viabilidade, devido à queda contínua da concentração celular.

Novas amostras foram descongeladas (Caso 12 e caso 18). No caso 18 havia mais células inviáveis do que viáveis e o material foi descartado. Já no caso 12, havia  $3,6 \times 10^6$  células/mL, com 85,72% de viabilidade. Com essa concentração celular, conseguimos então trabalhar com 18 poços contendo  $2 \times 10^5$  células.

Continuando o processo de padronização, decidimos incluir a própolis, nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g}$ /poço, para analisar seu efeito após 24 e 48 h, comparando com as células controle.

Após 24 horas de incubação, obtivemos os resultados expressos na Tabela 1 do Anexo.

**TABELA 1 DO ANEXO** - Viabilidade e concentração celular do Caso 12 com 24 e 48 h de leitura, frente à ação de 25, 50 e 100  $\mu\text{g}$  da própolis.

Caso 12	25 $\mu\text{g}$		50 $\mu\text{g}$		100 $\mu\text{g}$		Controle	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>Viabilidade (%)</b>	8,67	18,42	10,06	3,71	5,83	2,31	89	75,37
<b>Concentração celular (/ml)</b>	$1,17 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$0,92 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$4,75 \times 10^5$

Estes dados permitiram observar o efeito da própolis nessa amostra (Caso 12). Para confirmar o efeito e padronizar os tempos de leitura, bem como a concentração da própolis a ser utilizada, novos ensaios foram realizados (Casos: 2 - base e cabeça de pênis; 6; 7; 17 - pênis e inguinal; 20).

Neste período, o Departamento de Microbiologia e Imunologia, onde estavam sendo realizadas as culturas, começou a ser reformado, havendo contaminação de todas as culturas sendo, portanto, necessário descartar essas sete últimas amostras citadas anteriormente. Após o término da reforma, a concentração de própolis utilizada, o número de células, bem como o tempo de incubação do TVT com a própolis foram determinados em

experimentos pilotos realizados no Departamento de Microbiologia e Imunologia, do IB, UNESP - Campus de Botucatu.

Os tempos de leitura foram padronizados em 6, 24 e 48 h, a concentração da própolis utilizada foi de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g}$ , com  $2 \times 10^6$  células.