

Conceição Aparecida Dornelas
Manoel Odorico de Moraes Filho

Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese



Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese

Presidente da República (interino)

Michel Miguel Elias Temer Lulia

Ministro da Educação

José Mendonça Bezerra Filho

Universidade Federal do Ceará - UFC

Reitor

Prof. Henry de Holanda Campos

Vice-Reitor

Prof. Custódio Luís Silva de Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Antônio Gomes de Souza Filho

Pró-Reitora de Administração

Prof.^a Denise Maria Moreira Chagas Correa

Imprensa Universitária

Diretor

Joaquim Melo de Albuquerque

Conselho Editorial

Presidente

Prof. Antonio Cláudio Lima Guimarães

Conselheiros

Prof.^a Angela Maria R. Mota Gutiérrez

Prof. Ítalo Gurgel

Prof. José Edmar da Silva Ribeiro

**Conceição Aparecida Dornelas
Manoel Odorico de Moraes Filho**

Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese



Fortaleza
2016

Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese

Copyright © 2016 by Conceição Aparecida Dornelas, Manoel Odorico de Moraes Filho

Todos os direitos reservados

IMPRESSO NO BRASIL / PRINTED IN BRAZIL

Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC)
Av. da Universidade, 2932, fundos – Benfica – Fortaleza – Ceará

Coordenação editorial

Ivanaldo Maciel de Lima

Revisão de texto

Adriano Santiago

Normalização bibliográfica

Luciane Silva das Selvas

Programação visual

Sandro Vasconcellos / Thiago Nogueira

Diagramação

Sandro Vasconcellos

Capa

Heron Cruz

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Bibliotecária Luciane Silva das Selvas CRB 3/1022

D712c Dornelas, Conceição Aparecida
 Carcinogênese experimental de bexiga e o Índice de Carcinogênese Conceição
Aparecida Dornelas, Manoel Odorico de Moraes Filho. - Fortaleza: Imprensa
Universitária, 2016.
 182 p. ; 21 cm. (Estudos da Pós-Graduação)

ISBN: 978-85-7485-249-2

1. Carcinogênese. 2. Bexiga - câncer. 3. Câncer. I. Dornelas, Conceição
Aparecida. II. Moraes Filho, Manoel Odorico de. III. Título.

CDD 616

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, ao professor Manoel Odorico de Moraes, pela orientação durante o doutorado em Cirurgia;

Aos professores da Pós-graduação em Cirurgia da UFC;

Às secretárias da Pós-graduação em Cirurgia, UFC, Luciene e Magda;

À professora Telma Leda G. de Lemos, do Laboratório de Química da UFC, pela calorosa recepção em seu laboratório encantado;

Ao professor Irineu Lima Albuquerque, da Unifor, pela extração da própolis durante o seu doutorado de Química na UFC;

Ao professor Paulo Roberto Carvalho de Almeida, do DPML, Faculdade de Medicina da UFC, pela colaboração direta e orientação na histopatologia;

Ao professor Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru, pelas avaliações estatísticas;

Ao professor José Daniel Vieira de Castro, do Departamento de Radiologia da UFC, pelos exames de ultrassonografia;

Às técnicas do Laboratório de Oncologia Experimental, Silvana e Luciana;

Ao técnico de biotério Sr. Bento e sua família;

Às técnicas do Laboratório de Patologia do DPML UFC, em especial à Do Céu;

Aos acadêmicos, hoje profissionais formados: Thiago Alves Dias (médico) e Adjair Jairo Silva (dentista);

À professora Maria Cristina Marcucci, da Uniban, que realizou a tipificação e quantificação de própolis;

Ao professor Nada Orsolic, do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade de Zagreb, na Croácia.

“[...] Nem há tempos futuros nem pretéritos. É impróprio afirmar que os tempos são três: pretérito, presente e futuro.

Mas talvez fosse próprio dizer que os tempos são três: presente das coisas passadas, presente das coisas presentes, presente das coisas futuras. Existem, pois, estes três tempos na minha mente que não vejo em outra parte: lembrança presente das coisas passadas, visão presente das coisas presentes e esperança presente das coisas futuras.”

(Santo Agostinho, 400 d.C.)

APRESENTAÇÃO

A carcinogênese de bexiga é um processo patológico humano que envolve muitos fatores de riscos ambientais pela contaminação da água, dos alimentos e do ar, que estão no cerne das questões que envolvem a poluição ambiental e a sobrevivência do homem na terra, desde os efeitos ocupacionais nas grandes indústrias de anilina e tecidos na Alemanha do século passado e, mais atualmente, os que envolvem os derivados de petróleo, tais como a gasolina, tintas entre outros. Em virtude dos acidentes ocorridos, a energia nuclear, tão festejada pela ciência, está ampliando os números do câncer de bexiga. Outro escândalo não resolvido é a contaminação dos lençóis freáticos com arsênico em países da Ásia, sem falar no consumo indiscriminado de analgésicos nos países ocidentais. Todos esses fatores elevaram em mais de 40% a incidência da neoplasia vesical em apenas 20 anos. Estamos em um momento crítico da história humana e do meio ambiente; é preciso trabalhar e fazer algo para o futuro. É preciso estudar mais estas questões.

Este livro é objeto de minha tese de doutorado (mais especificamente de sua parte ainda não publicada), desenvolvida no Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará: “Efeitos da Própolis verde e da *L*-lisina na carcinogênese e angiogênese de tumores de bexiga, induzidos pelo BBN em ratas Wistar” sob a orientação do professor Manoel Odorico de Moraes; portanto, escrevemos este e os demais trabalhos por ela gerados. Foram publicados três artigos na revista *Acta Cirúrgica Brasileira*: “Chemoprevention with green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer”, “Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats” e “Potential Chemoprotective effects of green propolis, L-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of

wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis”. Todos os resultados publicados são originais e acrescentam à ciência um pouco mais do que já se conhecia, entretanto outra contribuição vem do sistema de escore, já concluído e apresentado em defesa pública, porém ainda não abordado nos artigos citados, tratando-se de uma nova ferramenta para avaliação da carcinogênese experimental de bexiga: o Índice de Carcinogênese (IC). O interesse maior desta publicação está no fato de que o IC foi validado e é eficaz na avaliação da carcinogênese experimental de bexiga, uma motivação a mais para a publicação do seu conteúdo.

Conceição Dornelas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
O câncer de bexiga	13
A carcinogênese	15
O modelo para estudo da carcinogênese de bexiga	21
O índice de carcinogênese: a ideia.....	32
Própolis	33
Extração da própolis	40
 O EXPERIMENTO	 43
Os animais.....	43
Condições de manutenção do biotério e proteção individual e ambiental.....	44
As substâncias utilizadas.....	46
O BBN	46
As soluções neutralizantes	47
O Celecoxibe.....	47
A L-lisina	47
A extração da própolis verde em L-lisina	48
Tipificação e quantificação da própolis.....	51
Teste de atividade antioxidante	52
Delineamento do experimento	53
Estudo da macroscopia da bexiga fixada em formol	55
Avaliação da carcinogênese: análise histopatológica.....	56
O Índice de Carcinogênese através de escores por lesão	57
Escores por lesão.....	58
Exames de ultrassonografia.....	60
Eutanásia	61
A tipificação da própolis	62
Atividade antioxidante da própolis	64

Variação temporal da massa corporal	67
Avaliação do peso corporal e peso do fígado, baço e rins	69
Evolução clínica, mortalidade, sobrevida e causa <i>mortis</i> dos animais.....	71
Evolução clínica:.....	71
Análise de sobrevida	74
Causa mortis.....	79
Ultrassonografia dos tumores.....	81
Exame macroscópico	86
Avaliação microscópica da carcinogênese.....	90
Subtipos histopatológicos de carcinomas	97
Avaliação dos subtipos histológicos	97
Índice de carcinogênese calculado.....	104
Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas.....	110
Avaliação estatística da incidência de carcinoma de bexiga.....	111
Avaliação da multiplicidade de carcinoma: (número de carcinomas por bexiga).....	115
Grau de invasão	121
Grau de atipias	124
Grau de diferenciação	125
Análise estatística do número de carcinomas e sua classificação por subtipos histopatológicos	129
 A VALIDAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGENESE.....	 133
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 149
 REFERÊNCIAS.....	 151
 APÊNDICE	 172
 ANEXO	 179
 OS AUTORES	 181

INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga

A relevância para o estudo da carcinogênese vesical está no fato de que o câncer de bexiga tem alta prevalência no nosso meio. Estima-se que, em 2015, nos EUA, serão diagnosticados 74.000 casos e morrerão 16.000 pessoas (NACIONAL CANCER INTITUTE, 2015). No Brasil, a previsão para o ano de 2016, segundo o (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016) é de 9600 casos e a incidência de 7,26/100.000 casos para homens e de 2,76/100.000 para mulheres. Sua maior incidência, entretanto, ocorre, principalmente, no norte da Europa, em especial na Escócia e Dinamarca. A Eucan (International Agency for Research on Cancer) previu, em 2012, uma incidência para a Bélgica de 26,5/100.000 e de 21,9/100.000 para a Dinamarca (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014). De 1985 a 2006, nos Estados Unidos da América, a incidência aumentou em 50% no homem e 25% na mulher, e isso não se deve ao avanço tecnológico, pois raramente o câncer de bexiga é um achado incidental (GOLIJANIN et al., 2006). Na Coreia e na China, é o tumor do sistema urinário mais frequente.

É uma doença diretamente ligada ao ambiente em que vive o indivíduo, por isso a incidência e prevalência aumenta com a idade e se relaciona com a exposição direta de toxinas (JEMAL et al., 2008 apud WOOD JÚNIOR, 2012) e de substâncias provenientes da ocupação do indivíduo nas indústrias químicas de tintas, petróleo, gasolina, bem

como pela ingestão de água contaminada com arsênico, ingestão de alimentos contaminados por energia radioativa (pós-bombas atômicas no Japão e desastre de Chernobyl na Ucrânia), abuso de uso de analgésicos (fenacetina, paracetamol), uso de tabaco e doentes portadores de esquistossomose vesical, muito comum nos países da África e Oriente Médio (FUKUSHIMA; WANIBUCHI, 2000).

O principal tipo histológico dos tumores de bexiga é o carcinoma de células transicionais (CCT). Sendo um tumor de células transicionais, o CCT pode ocorrer desde a pelve renal até a uretra. A característica mais importante dessa doença são as múltiplas recorrências após ressecção transuretral associada ou não a tratamento local com BCG ou quimioterápicos. A maioria dos tumores de bexiga (70 a 80%) são tumores superficiais exofíticos e papilares bem diferenciados e não penetram na membrana basal. Outra via biológica do tumor se faz através de lesão epitelial de carcinoma *in situ*, que está quase sempre associada a tumores papilares. Existe uma relação direta entre carcinoma *in situ* e CCT invasivo. A genética, a citogenética e a imunohistoquímica têm mostrado uma alta proporção de deleções e mutações do P53 em carcinoma *in situ* e câncer invasivo de bexiga. O carcinoma *in situ* parece ser um precursor de tumores invasivos de bexiga. O carcinoma superficial de bexiga só muito raramente apresenta estas alterações genéticas no P53, exceto em pacientes muito jovens (MESSING, 2007).

O CCT é uma doença multifocal e diferentes conceitos vêm tentando explicar esse fenômeno de extraordinária importância clínica, principalmente no que se refere à recorrência de 20 a 60% da doença em dois anos, após tratamentos convencionais. Duas teorias são propostas para explicar a multifocalidade e as recorrências: a teoria monoclonal e a teoria policlonal ou *field effect* (KNOWLES, 2006). A teoria monoclonal foi sugerida em estudos citogenéticos, ou seja, tumores sincrônicos ou metacrônicos de bexiga são derivados de focos de micrometástases que migrariam do sítio de origem (SIMON et al., 2001). Em oposição, investigação de alterações morfológicas e mapeamento histoquímico em áreas adjacentes aos sítios tumorais resultaram em conclusões de uma teoria policlonal. Em síntese, segundo essa teoria,

todo urotélio é instável, com muitos clones, dando origem a tumores policlonais (TAKAHASHI et al., 1998; KNOWLES, 2006). A maioria dos tumores de bexiga é monoclonal e pequena porcentagem é policlonal (JONES et al., 2005). Recentemente, estudos utilizando análise genética através de hibridização genômica comparativa e análise de mutação do gene FGFR3, sugeriram uma origem monoclonal (KAWANISHI et al., 2007).

A possibilidade de recorrência do CCT na forma invasiva (15 a 20%), o sofrimento causado aos pacientes (altos índices de recorrências, múltiplas ressecções endoscópicas e inúmeras instilações intravescicais de BCG ou quimioterápicos) e o aumento progressivo da incidência da doença e do número de mortes são fatores que justificam pesados investimentos em pesquisas de outras possibilidades terapêuticas, principalmente quimiopreventivas, levando-se em consideração que se está diante de uma realidade ambiental carcinogênica, propícia ao aumento progressivo desta doença, evidenciada em observações clínicas e epidemiológicas.

A carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo com diversas etapas que envolvem múltiplos eventos genéticos e epigenéticos (YU et al., 2002; TING; McGARVEY; BAYLIN, 2006).

Os principais alvos da lesão genética pertencem a quatro classes de genes: os proto-oncogenes (genes promotores de crescimento), genes supressores do tumor (inibidores do crescimento), genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e genes do reparo do DNA.

Para que uma célula alcance um fenótipo maligno, ela precisa adquirir algumas características básicas (baseadas na perda de atividades dos alvos citados): autossuficiência no sinal do crescimento, insensibilidade dos sinais inibidores do crescimento, evasão da apoptose, defeitos no reparo do DNA, potencial infinito de replicação, angiogênese mantida, capacidade de invadir e metastizar, além de vencer a imunidade e a rejeição (STRICKER, 2013).

Os proto-oncogenes transformam as células com a mutação de apenas um de seus alelos. Entre outros, tem-se: ERB, RET, K-RAS, H-RAS, N-RAS, C-MYC, N-MIC, N-MYC, ciclina D, ciclina E CDK. Os genes supressores de tumor necessitam de que ambos os alelos estejam lesionados para transformar as células. Perdem sua função por inativação ou perda de um de seus alelos. São genes supressores: NF, APC/ β catenina, PTEN, RB, p53, Ink4a, BRCA. Os genes do reparo do DNA afetam a proliferação celular (sobrevida) e reparam as lesões causadas por outros genes, inclusive proto-oncogenes, genes supressores do tumor e genes que regulam a apoptose. A incapacidade de genes do reparo deixa a célula susceptível à transformação neoplásica. Ambos os genes do reparo devem ser inativados para induzir instabilidade genômica (STRICKER, 2013).

Os eventos epigenéticos referem-se a toda mudança reversível e herdável no genoma funcional que não altera a sequência do nucleotídeo, mas muda a expressão gênica (FLANAGAN, 2007). Esses eventos estão ligados à metilação do DNA. Em células tumorais, foram identificados dois padrões de metilação do DNA: a hipermetilação e a hipometilação generalizada. A hipermetilação, caracterizada principalmente pela metilação do DNA em região promotora de genes, ou seja, a adição de grupos metil à citosina em ilhas de sequência de DNA CpG (uma citosina ligada a uma guanina) em genes supressores de tumores, impedindo a transcrição, levando ao silenciamento destes genes. A hipometilação generalizada do genoma traz instabilidade cromossômica, ativação do retrotransposon (expressão de elementos genéticos móveis do genoma, podendo gerar mutagênese insercional) e ativação de proto-oncogenes, principalmente de genes promotores do crescimento e desenvolvimento tumoral (LAIRD, 2005; CLARK, 2007).

Outras duas alterações epigenéticas foram identificadas na carcinogênese: a primeira em histonas, que podem ocorrer com a ligação de grupo acetil ao aminoácido lisina no final de duas histonas; e a segunda em RNAs não codificadores (RNAmi – micro RNA), com silenciamento pós-transcricional de genes com o bloqueio da transdução ou degradação do RNA alvo (LAIRD, 2005; FRAGA; ESTELLER, 2005; COLLIER; FORMAN; MILLER, 2007).

As alterações epigenéticas nem sempre são focais e, às vezes, elas podem atingir, de forma global, grandes regiões, trazendo disfunções semelhantes às que ocorrem em alterações genéticas grosseiras, como na deleção e perda heterozigótica. Qualquer câncer pode simultaneamente apresentar alterações genéticas e epigenéticas, e é difícil diferenciar se uma mudança genética, por exemplo, é causa ou consequência de uma alteração epigenética. O que se pode dizer é que a alteração epigenética envolve metilação de DNA e acetilação de histona e produz grande instabilidade genética, proporcionando, com isso, inevitáveis alterações genéticas (CLARK, 2007).

Em uma célula normal, os proto-oncogenes expressam proteínas que se ligam aos receptores dos fatores de crescimento, ativam esses receptores que, uma vez ativados, ativam determinadas proteínas transdutoras de sinais, seguindo-se a transcrição do DNA, iniciando o ciclo celular e levando à multiplicação da célula. Oncogenes (proto-oncogenes mutados) promovem divisão celular sem precisar de sinais mitogênicos normais. Suas oncoproteínas podem se comportar como ligantes, como receptores de fator de crescimento, transdutores de sinal, fatores de transcrição e componentes do ciclo celular, ou seja, podem burlar toda a sistemática da divisão celular, objetivando a autossuficiência nos sinais de crescimento. As mutações nos genes que regulam estas atividades são observadas em todos os tumores; o que diferencia são as vias genéticas destas mutações (STRICKER, 2013).

O crescimento celular normal é o resultado de um balanço entre controle positivo (proto-oncogenes e fatores de crescimento) e controle negativo (senescência, apoptose, supressores de tumor). Esse intrincado balanço entre duas forças opostas é necessário para renovação tecidual enquanto mantida a homeostase. Mas esse balanço não é estático, ele é dinâmico, principalmente quando as células são submetidas a várias agressões patogênicas. Quando um proto-oncogene mutado (oncogene) é ativado, é necessário que esteja atuando um gene supressor para que ponha um fim à proliferação. A falência desse sistema leva a célula a uma proliferação descontrolada e a tumorigenesis. Dessa forma, deve existir cooperação entre oncogenes e inativação de genes supressores de tumor para o surgimento das neoplasias (YAO et al., 2004; MO et al., 2007).

Um tumor maligno necessita progredir ao nível molecular (acumular alterações genéticas) para atingir as diversas características fenotípicas, como crescimento local, invasão e capacidade de formar metástases.

A carcinogênese comumente é dividida em três estágios independentes: iniciação, promoção e progressão.

A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese e resulta de alterações irreversíveis no DNA. Para que ocorra a iniciação, a alteração do DNA tem que ser herdada e tem que passar por, pelo menos, um ciclo de proliferação para que a alteração de DNA se torne permanente (PITOT, 1993). A iniciação é um evento muito comum e, às vezes, ocorre espontaneamente e pode ser facilmente induzido em modelos experimentais e em humanos. No entanto, a maioria das células iniciadas nunca segue os estágios subsequentes e permanece quiescente por toda a vida. O estágio de iniciação tem sido pouco estudado devido à dificuldade de se isolar e caracterizar uma célula iniciada (STRICKER, 2013).

A promoção é efetuada por agentes promotores em células iniciadas. Os promotores são capazes de levar células iniciadas à proliferação e, com isso, desenvolver mutações adicionais. Os promotores não são capazes de produzir mutação, mas a condição de manter a proliferação celular é obrigatória para que possam contribuir para a carcinogênese (PITOT, 1993).

O estágio de progressão foi descrito pela primeira vez por Founds, em 1954 (apud PITOT, 1989), e inicialmente o conceito de progressão se referia à fase subsequente à iniciação, como um processo inteiro da carcinogênese após a iniciação. Entretanto, devido à fase de promoção ser reversível e tratar-se de um processo não genético e que segue imediatamente o estágio de iniciação, o termo “progressão” deve ser modificado. Por vezes, a agentes carcinogênicos em altas doses, em condições específicas, pode ser aplicado o conceito original de Founds. Mais comumente, o estágio de progressão desenvolve-se de células no estágio de promoção. As células malignas possuem maior alteração genética, que envolve mudanças estruturais no cariótipo da célula. Em síntese, o estágio de progressão trata-se de uma continuidade, uma evo-

lução de anormalidades cromossômiais que pode levar a célula a invadir e metastisar (PITOT, 1989; PITOT, 1993).

Os tumores sólidos são compostos por dois compartimentos: o parênquima e o estroma. O parênquima é constituído pelas células malignas e o estroma é o suporte de tecido conjuntivo vascular. Ambos estão conectados entre si por moléculas de sinalização (DVORAK, 2003).

O papel do estroma (micro meio ambiente) no desenvolvimento do câncer é fundamental. Ele não apenas suporta a carcinogênese, mas também contribui ativamente para a iniciação, progressão e metástase (HU; POLYAK, 2008).

Durante a progressão, as células que compõem o tumor são submetidas às mudanças epigenéticas e fenotípicas. Sinalizações parácrinas entre células do epitélio e do estroma são importantes para a regulação da proliferação e da invasão, para a angiogênese e para o comportamento metastático de células cancerosas.

Nem sempre a caracterização de anormalidades genotípicas de carcinomas pode delinear manifestações clínicas e fenotípicas do tumor. A tentativa de classificação das alterações genéticas associada à evolução do tumor não está definitivamente afinada. Parece haver um descompasso entre as características das células tumorais e o comportamento biológico tumoral. Esse descompasso estaria ligado aos efeitos que o estroma exerce no desenvolvimento do tumor (HU; POLYAK, 2008).

Utilizando um sistema de análise serial de expressão gênica e examinando células epiteliais normais de mama, de carcinoma *in situ* e células de carcinoma invasivo de mama observou-se uma mudança dramática na expressão gênica não apenas nas células tumorais, mas também nas células endoteliais, mioepiteliais, miofibroblastos e leucócitos durante a progressão do câncer de mama. A presença de alterações na expressão gênica sem alterações genéticas fez pensar em alterações epigenéticas (ALLINEN et al., 2004; HU; POLYAK, 2008).

As metástases têm sido estudadas como um bom exemplo da interação entre microambiente e tumor. Receptores expressados por células neoplásicas podem se ligar a quimiocinas expressadas pelo órgão-alvo de metástase, como nas células do câncer de mama, que podem

produzir receptores CXCR4, e o pulmão (principal sítio de metástase para câncer de mama), que é rico em quimiocinas CXCL12.

As células tumorais também enviam sinais para a medula óssea mobilizar BMD-MSCs (*stem cells* mesenquimais). Estas células medulares são recrutadas pelo tumor primário e também mobilizadas para outros órgãos, criando um nicho pré-metastático. A interação entre as BMD-MSCs com o tumor primário aumenta a motilidade celular, ampliando a capacidade de invasão e metástase via interação parácrina. As BMD-MSCs podem se diferenciar em miofibroblasto e outras células estromais para suportar o crescimento e a progressão do tumor (HU; POLYAK, 2008).

Pesquisadores estão concentrados nas alterações moleculares observadas nas três fases da carcinogênese, e o destaque tem sido para o papel de receptores e transdutores de sinais e ativadores da transcrição, na iniciação e progressão dos tumores, e suas cascatas até o núcleo de célula transformada em diversos tipos de câncer em animais e humanos. Um importante ativador da transcrição é a família STAT.

Os STAT (transdutores de sinal e ativadores da transcrição) foram originalmente descobertos como mediadores de vias sinalizadoras de citocinas, em 1993, por James Darnell (apud CALÓ et al., 2003). Com o desenvolvimento da tecnologia de investigação genômica e da imunohistoquímica, a ação do STAT na carcinogênese vem sendo largamente investigada. A família STAT é constituída por STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6, que são codificados por diferentes genes (CALÓ et al., 2003).

O STAT3 é a principal proteína da família STAT; encontra-se no citoplasma em forma inativa e é ativada pela fosforilação, em caso de hipóxia, ou seja, se houver energia proveniente da glicólise anaeróbica e impedimento de fosforilação oxidativa. Os efeitos do STAT3 são mediados e manifestam-se através da expressão de genes-alvo de STAT3. Os genes-alvo conhecidos são reguladores do ciclo celular, genes antiapoptóticos, fatores pró-angiogênicos e genes envolvidos com a invasão e metástase tumoral (YU et al., 2002; CALÓ et al., 2003; LEEMAN-NEILL, 2008).

Apesar de a ativação pela fosforilação do STAT3 sempre ser citada como importante para a oncogênese, achados experimentais têm

sugerido que o STAT3 ativado não fosforilado (porém submetido a mutação por vírus) tem sido capaz de induzir a expressão de alguns genes regulados pelo STAT3 fosforilado como os genes c-fos, c-jun, bcl-xl, c-mic dp-1. Isto sugere que o STAT3 ativado não fosforilado pode também contribuir para a carcinogênese (YANG et al., 2005; LEEMAN-NEILL, 2008).

O STAT3 não apenas está envolvido no processo da oncogênese, mas igualmente é necessário na angiogênese, fundamental para desenvolvimento, invasão e metástase tumoral.

O modelo para estudo da carcinogênese de bexiga

O modelo clássico de carcinogênese química de bexiga em ratos mais conhecido é o que utiliza o BBN (N-butil-N-[4-hidroxibutil] nitrosamina).

Os primeiros experimentos de observação da carcinogênese do trato urinário em animais datam de 1895, quando Rehn começou a investigar possíveis fatores etiológicos do câncer de bexiga em homens trabalhadores da indústria de anilina, na Alemanha (BRYAN; COHEN, 1984).

Mas as bases para carcinogênese de bexiga foram apresentadas por Huerpe, em 1938, com a 2 – naphtylamina (um derivado da anilina) administrada em cães. A introdução ao estudo de carcinogênese em roedores ocorreu um pouco mais tarde, em 1941, com o uso oral de 2 – acetilaminofluorene (AAF). Porém, foi no final dos anos 1960 e início da década de 1970, que foram sintetizados carcinógenos, órgão específico para bexiga de roedores: o BBN (N-butil-N-[4-hidroxibutil] nitrosamina, administrado em água), o FANFT (N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-thiazolil] formamida, administrado na dieta) e o MNU (N-metil-N-nitrosourea, instilado na luz vesical) (BRYAN; COHEN, 1984).

O BBN é um potente carcinógeno de ação seletiva no epitélio de bexiga de ratos. Ele foi sintetizado pela primeira vez por Drunkrey, em 1964 (BERTRAM; GRAIG, 1972).

Na maioria dos estudos, BBN é administrado na água de beber a 0,05%, porém alguns trabalhos utilizam a administração intragástrica (KUNZE; CHOWANIEC, 1990).

É considerado um carcinógeno completo, ou seja, é capaz de iniciar e promover a carcinogênese de bexiga. É carcinógeno direto e indireto: produz neoplasia vesical se instilado na bexiga ou através de seu metabólito hepático, quando ingerido via oral.

O BBN é administrado pela via oral, metabolizado no fígado e eliminado pela urina na forma de outras substâncias. O mais importante metabólito do BBN eliminado pela urina é o butil (3-carboxipropil) nitrosamina (BCPN), que resulta da oxidação, por enzimas hepáticas (álcool/aldeído desidrogenase) do radical álcool do BBN para um radical carboxil (HASHIMOTO, SUZUKI, OKADA, 1974). Por α -hidroxilação BCPN e BBN são quimicamente clivados em seu correspondente alquilcarbono que se ligam covalentemente ao DNA, levando à carcinogênese vesical.

Da mesma forma que o carcinógeno é ativado, ele pode ser detoxificado pelo fígado por aumento de expressão de algumas enzimas, como a GSTs (Glutathione-S-transferase) e UGTs (UDP-Uridinodifosfato glucuronosil transferase), que vão conjugar carcinógenos (neste caso específico, o BBN) e cofatores (glutathione e ácido glicurônico), gerando a BBN glucuronide. Quando isso ocorre, há diminuição de BCPN pelo fígado, suprimindo, assim, a carcinogênese vesical. O aumento da enzima UDP ajuda na proteção da carcinogênese pelo aumento da solubilidade de compostos químicos genotóxicos (IIDA et al., 2004; IIDA et al., 2007).

Este processo de aumento de enzimas de detoxificação constitui a fase II de detoxicação enzimática e tem importante papel na proteção contra carcinógenos químicos. Alguns compostos com ação antioxidante, como o 2,3 – butil - 4 hidroxianisole, o 1,2 – ditiole 3-tione e isotiocianatos, têm sido citados como importantes ativadores da fase II. Genes da fase II são regulados pela via ARE/EpRE (elemento de resposta oxidante e elemento de resposta eletrofílica). O Nrf2, fator de transcrição nuclear, se liga ao ARE e inicia a expressão genética das vias de sinalização de estresse oxidativo na região promotora destes genes, mediando a expressão de enzimas protetoras (fase II), via heterodimerização com a proteína Maf (IIDA et al., 2004; IIDA et al., 2007).

Administrando Oltipraz o 4-metil-5[2-pyrazini]-1,2-ditiole-3-tione (um dos mais potentes indutores da fase II), em camundongos

que receberam BBN, constatou-se uma diminuição de BCPN. Camundongos nocaute para Nrf2 tiveram susceptibilidade aumentada para a carcinogênese vesical e abolição da eficácia do Oltipraz. A indução de detoxificação mediada pelo Nrf2 ocorre em células uroteliais periféricas e no fígado, aumentando a detoxificação e diminuindo o estresse oxidativo. Dessa forma, o Nrf2 tem um importante papel na prevenção de carcinogênese induzida pelo BBN (IIDA et al., 2007).

Tanto o BBN quanto o BCPN são carcinógenos, órgão específico para bexiga, e podem transformar células transicionais tanto *in vitro* (HASHIMOTO; SUZUKI; OKADA, 1972) quanto *in vivo* (HASHIMOTO; KITAGAWA, 1974). Apesar de o BBN ser reconhecidamente um carcinógeno, sítio específico para bexiga, existem estudos comprovando que ele também pode ser um iniciador da carcinogênese hepática (HAGIWARA et al., 1999).

Os outros metabólitos do BBN identificados na urina e em pequena quantidade são: butil (3-hidroxipropil) nitrosamina (BHPN), propil (4-hidroxybutil) nitrosamina (PHBN), butil (2-hidroxietil) nitrosamina (BHEN), butil (carboximetil) nitrosamina (BCMN), butil (2-oxopropyl) e nitrosamina (BOPN). Dentre esses metabólitos menores, tanto o BOPN quanto o BHEN, pela via oral, em ratos, podem induzir aparecimento de hepatoma e a última nitrosamina citada pode estimular o crescimento de papiloma de esôfago (OKADA; HASHIMOTO, 1974).

O conceito de iniciação e promoção é importante quando se utilizam modelos de carcinogênese vesical. O epitélio vesical é muito vulnerável e evolui com hiperplasia e metaplasia, na presença de cristais, corpo estranho, infecção urinária de repetição. Tudo que é ingerido ou secretado e eliminado via urinária, obrigatoriamente, passará pelo urotélio.

Nem sempre uma substância promotora de carcinogênese para um determinado tecido vai se comportar como promotora de carcinogênese para outro tecido em uma mesma espécie e em um mesmo animal. Isso pôde ser observado em avaliação experimental de ratos submetidos à carcinogênese da bexiga pelo BBN, que iniciou tanto células do epitélio vesical, como células hepáticas. Quando se administrou o L-ascorbato, na investigação de promoção de carcinogênese vesical e

hepática, no mesmo animal, ele teve uma ação promotora para carcinogênese vesical, mas não foi promotora da carcinogênese hepática (HAGIWARA et al., 1999).

Classicamente, os promotores da carcinogênese de bexiga foram descritos e classificados na década de 1980 (ITO; FUKUSHIMA, 1989; FUKUSHIMA, 1991), com recentes modificações (OLIVEIRA et al., 2006), (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação de promotores de câncer de bexiga.

TIPO	PROMOTORES DE CÂNCER DE BEXIGA
Sais de sódio ou potássio	Sacarina de sódio Ciclamato de sódio L-ascorbato de sódio Citrato de sódio Bicarbonato de sódio Eritorbato de sódio Fenobarbital sódico Carbonato de potássio com/sem ácido ascórbico
Compostos que induzem a urolitíase	Uracil Difenil
Antioxidantes	Hidroxianisole butilado Hidroxitolueno butilado Butil hidroquinona terciária Etoxiquina t-butilhidroxiquinona 2-t-butil-4-metilfenol
Agentes antineoplásicos	Adriamicina Mitomicina
Aminoácidos	DL-triptofano L-leucina L-isoleucina
Outras drogas	Componentes da urina (fração I e II) Alopurinol Ácido dimetilarsínico

Fonte: (ITO; FUKUSHIMA, 1989).

Todas as substâncias promotoras citadas no Quadro 1 atuam em doses e mecanismos específicos e todas elas levam à proliferação celular. Não são genotóxicas. Três hipóteses tentam explicar como a

concentração de sais de sódio e potássio pode afetar a carcinogênese vesical: o sódio e o potássio podem agir diretamente na célula, estimulando a síntese de DNA com proliferação celular; o sódio interage com várias moléculas, como as proteínas e, devido à competição com outros fatores urinários específicos, íons administrados ou metabólitos podem alterar a configuração e a função das macromoléculas; o sódio seria citotóxico, agindo diretamente pelo efeito osmótico. O difenil e o uracil atuam através de estímulos irritativos dos cálculos e cristais, aumentando a proliferação celular regenerativa. Não há hipóteses publicadas para explicar a promoção das demais substâncias citadas (ITO; FUKUSHIMA, 1989; FUKUSHIMA, 1991; OLIVEIRA et al., 2006).

Os agentes promotores de carcinogênese de bexiga podem ser muito úteis na constituição de modelos experimentais para estudo da carcinogênese de bexiga e são utilizados para este fim (OLIVEIRA, 1993), (Quadro 1).

Para o entendimento da carcinogênese de roedores, é preciso conhecimento da embriologia, da histologia do aparelho urinário e da histopatologia de tumores produzidos pelo BBN.

O sistema urinário de roedores é constituído pela pelve renal, pelos ureteres, bexiga e uretra. Sua parede é constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa parcialmente.

O epitélio da bexiga é constituído por três camadas: superficial, intermediária e basal. Na região de trígono vesical podem estar presentes até cinco camadas. No ureter e na pelve renal podem chegar a ter dez camadas. Entretanto, a papila renal é revestida por uma única camada de células cuboides (BRYAN; COHEN, 1984).

O urotélio normal é caracterizado por ser poliploide. As células basais são diploides, as intermediárias tetraploides e as superficiais octaploides.

A maior parte da bexiga é embriologicamente derivada da endoderme cloacal, formada de uma extensão da alantoide. No entanto, o trígono origina-se de ductos wolfiano mesodermiais. A complexa origem embriológica pode explicar a variedade de fenótipos expressados em neoplasia epitelial (KUNZE; CHOWANIEC, 1990).

Foi publicada, em 1992, uma classificação internacional de tumores do sistema urinário de ratos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Essa classificação foi baseada em estudos prévios de carcinogênese química, uma vez que tumores espontâneos do sistema urinário em ratos são raros.

As lesões pré-neoplásicas e neoplásicas são as surgidas na bexiga após a administração do carcinógeno.

As alterações pré-neoplásicas são as hiperplasias. A hiperplasia é uma proliferação de células do urotélio. Ela se divide em hiperplasia simples, papilar e nodular. Na hiperplasia simples, ocorre um aumento de células com crescimento do número de camadas a partir da membrana basal. Pode ser leve (quatro a seis camadas), moderada (sete a dez camadas) ou severa (acima de dez camadas). A hiperplasia papilar e a nodular ocorre como estágios seguintes (OYASU, 1995). A hiperplasia papilar consiste em projeções papilares para a luz vesical, constituída por camadas de células epiteliais ao redor de um eixo fibrovascular. A hiperplasia nodular apresenta um crescimento endofítico de células epiteliais bem diferenciadas, formando nódulos, com proliferação vascular acentuada. As hiperplasias podem ser focais, multifocais ou difusas e apresentar atipias celulares. Podem apresentar metaplasia escamosa (com produção ou não de ceratina), bem como metaplasia glandular.

As neoplasias são os papilomas, carcinomas e os tumores não epiteliais. Os papilomas de células transicionais podem apresentar um padrão exofítico ou endofítico. No papiloma exofítico, a apresentação histopatológica consiste de delicadas ramificações de eixos papilares cobertos por três ou mais camadas de células uroteliais bem diferenciadas. A atividade mitótica é baixa e o padrão endofítico pode coexistir. Podem apresentar metaplasia escamosa (com produção ou não de ceratina) ou metaplasia glandular. O papiloma invertido transicional é caracterizado pelo aspecto arborescente, com cordões celulares iniciando na superfície do urotélio, formando ninhos. Podem formar espaços císticos. O estroma possui numerosos capilares. A metaplasia escamosa e glandular pode estar presente.

Os papilomas podem apresentar atipias e, muitas vezes, o diagnóstico diferencial entre um papiloma e um carcinoma em animais é

difícil, não apenas pelas atipias, mas quando existirem dúvidas sobre a existência ou não de invasão de submucosa. Em humanos, o consenso para a classificação de neoplasia urotelial de bexiga em humanos, em 1998, classificou a lesão limítrofe entre papilomas e carcinomas como Lesão de Baixo Potencial Maligno (EPSTEIN et al., 1998).

Em ratos, os tumores espontâneos de bexigas são raros, menos de 1%, e estão predominantemente associados ao envelhecimento do animal. A alta incidência de neoplasia urotelial tem sido relatada em duas raças: a Brown/Norway e a Dark/Agouti, e estão associadas à presença de litíase (OLIVEIRA et al., 2006).

A carcinogênese de bexiga está na dependência da dose e do tempo de administração do carcinógeno. Alguns tumores podem se originar de hiperplasia papilar ou de transformações de papilomas de células transicionais (KUNZE, SCHAUER, SHATT, 1976; OYASU et al., 1987; KUNZE; CHOWANIEC, 1990).

O aspecto macroscópico de tumores de bexiga induzidos experimentalmente tem um padrão exofítico com crescimento papilar, polipoide ou com aspecto de couve-flor. A base do tumor pode ser sésil ou pediculada. Podem ser lesões únicas ou múltiplas e localizar-se em qualquer região da bexiga. Os tumores tendem a se tornar confluentes e, às vezes, é impossível separar essas lesões umas das outras. Neoplasias exofíticas ocasionalmente podem atingir um grande volume, ocupando toda a luz vesical. Tumores grandes podem apresentar hemorragias e necrose, causando hematúria. Podem ainda causar obstrução em nível de junção ureterovesical e, como consequência, causar ureterohidronefrose uni ou bilateral, com consequente pielonefrite e morte do animal. Tumores invasivos se infiltram na parede da bexiga e penetram em tecidos adjacentes. Em tumores vesicais induzidos por carcinógenos químicos, a metástase é rara (0,3%) e se dá preferencialmente para pulmões e linfonodos regionais. Parece que a incidência de metástase está relacionada com a espécie e também com o tipo histológico. Há descrição de até 13% de incidência em ratos Sprague-Dawley, baixa incidência em carcinomas de células transicionais e até 50% de carcinomas de células escamosas (KUNZE; CHOWANIEC, 1990).

O carcinoma de células transicionais pode evoluir com diferenciação escamosa, glandular ou pseudoglandular. Caso isso ocorra, tendem a se tornar mais invasivos. O termo diferenciação é utilizado para caracterizar pequenos focos de carcinoma escamoso ou de adenocarcinoma em carcinoma de células transicionais. A diferenciação pseudoglandular pode ocorrer. Trata-se de formações pseudoglandulares, com centro necrótico (BRYAN; COHEN, 1984), lembrando comedocarcinomas. Caso o componente de diferenciação seja maior e mais expressivo, a associação entre carcinoma transicional e outro tipo histológico é denominada de tumor misto (OYASU, 1995).

Carcinoma de células escamosas ocorre na frequência de 5,5% em ratos (KUNZE; SCHAUER, 1977), quando sob uso de BBN e tendem a ser rapidamente invasivos.

A indução de adenocarcinomas em bexigas de ratos é rara. Com BBN a incidência foi de 2,2% (KUNZE; SCHAUER, 1977). Carcinoma de células transicionais com diferenciação glandular foi observado numa incidência de 21% (FUKUSHIMA et al., 1976).

Bertram e Ohno demonstraram que o tumor induzido pelo BBN sofre influência do hormônio testosterona, modulando a ação do carcinógeno, antecipando o aparecimento de tumores em camundongos. Porém não existem relatos desta influência hormonal em carcinogênese de bexiga pelo BBN em ratos, embora o N-hydroxy-N-2-fluorenilacetamida seja mais carcinogênico em bexiga de ratos (BERTRAM; GRAIG, 1972; OHNO, 2000).

As mudanças histopatológicas sequenciais do epitélio vesical, na indução da carcinogênese pelo BBN, estão relacionadas com a dose e a susceptibilidade de diferentes espécies (ITO et al., 1969; ITO et al., 1973; ITO, 1976). O modelo de carcinoma induzido em ratos, via oral e em determinada dose, é do tipo papilar, pediculado, usualmente múltiplo e superficial. Quando a dose é aumentada e o tempo de administração prolongado, a tendência é se tornar invasivo (KUNZE, 1976). Dessa forma, o modelo de carcinoma de bexiga em ratos é adequado para estudos experimentais do carcinoma papilar de bexiga humano (OYASU, 1995). O modelo de carcinomas de bexiga com o BBN em camundongos é do tipo invasivo não papilar (HIROSE et al., 1976).

Diferentemente do modelo em ratos, em camundongos a evolução da carcinogênese apresenta-se com displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, lembrando o carcinoma *in situ* de bexiga no homem, um bom modelo para estudo de carcinoma invasivo de bexiga (OHTANI et al., 1986).

Baseados nos estudos anteriores de Cohen (1983), Kunze (1976) e Oyasu (1987), foi proposta a histogênese da carcinogênese de bexiga em roedores (OYASU, 1995) na seguinte sequência (Figura 1).

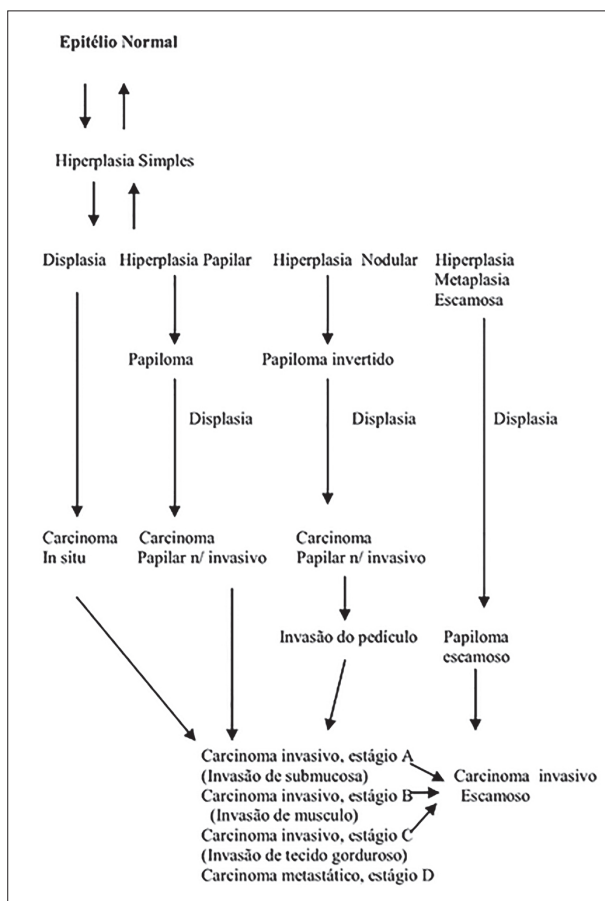


Figura 1 – Histogênese da carcinogênese de roedores.

Fonte: (OYASU, 1995).

Existem vários parâmetros que podem afetar a carcinogênese de bexiga, como dieta, fluidos, pH urinário, volume osmolar, cátions, ânions e proteínas, e esses parâmetros diferem entre homem, rato e camundongo. Portanto, as semelhanças e diferenças entre as espécies homem e modelos devem ser estudadas.

Há muitas semelhanças entre a estrutura celular que compõe o epitélio da bexiga de roedores e do homem, bem como sua origem embriológica. Entretanto, a osmolaridade em ratos e camundongos varia de 300 a 1500 mOsm; no homem é de 500 mOsm. Essa diferença tem importância na carcinogênese, uma vez que a urina nos animais é bem mais concentrada que no homem, possibilitando uma maior concentração de carcinógenos. A concentração de proteína na urina de roedores é 100 a 1000 vezes maior que a observada em humanos. E esta proteína encontrada em ratos, principalmente em machos (10 x mais que em fêmeas), é de baixo peso molecular $\alpha_{2\mu}$ -globulina. No homem, a proteína é de alto peso molecular, especialmente a albumina (COHEN, 1995; RODENT BLADDER CARCINOGENESIS WORKING GROUP, 1995).

O pH, dentre estes parâmetros, sem dúvida, é o mais importante e o que mais varia em função da alimentação e ingestão de fluidos. Ele pode potencializar ou inibir a ação de eletrólitos na formação de litíase urinária que, por sua vez, é importante na carcinogênese vesical por elementos não genotóxicos. Sais de cálcio precipitam em pH alto e sais de urato precipitam em pH baixo. A litíase urinária no homem é muito frequente, porém a associação entre litíase e câncer de bexiga no homem é rara. Entretanto, em ratos e camundongos, cristais e cálculos urinários aumentam a probabilidade de carcinogênese vesical (COHEN, 1995; RODENT BLADDER CARCINOGENESIS WORKING GROUP, 1995).

O epitélio vesical é semelhante entre as espécies; no entanto, existem diferenças anatômicas, que podem explicar fisiopatologicamente a associação entre cálculo e carcinogênese em animais. Durante o esvaziamento vesical, o sistema urinário dos roedores está na horizontal e, no homem, está na vertical. Quando a bexiga contrai, toda ela se “enruga”, exceto a região do trígono. Quando existem cálculos no interior da bexiga de ratos, esses cristais soltos na parede anterior, com a contração, promovem um dano de toda mucosa. Em humanos, corpos estranhos se lo-

calizam no trígono, a região que não contrai durante a micção. Com isso, diminui o dano na mucosa. Por essa mesma razão anatômica, humanos eliminam mais rapidamente os cristais que estão no interior da bexiga. Os cálculos no homem, quando causam obstrução, causam dor, na maioria das vezes, e isso faz com que seja providenciado tratamento e desobstrução. Dessa forma, fatores anatômicos podem tornar os roedores mais susceptíveis à carcinogênese de bexiga (DeSESSO, 1995; RODENT BLADDER CARCINOGENESIS WORKING GROUP, 1995).

Esses conceitos são muito importantes, como foi dito anteriormente, pois alguns centros de pesquisas têm utilizado o BBN por quatro a oito semanas e, após esse período, utilizam o uracil, constituindo modelos mais econômicos para estudo da carcinogênese vesical. A fisiopatologia da carcinogênese de bexiga pelo uracil está pautada nesses conhecimentos e na sua condição de promotor de carcinogênese de bexiga (OLIVEIRA, 1993).

A maioria dos tumores de bexiga em humanos manifesta-se como carcinoma de células transicionais puro. Também no rato, quase 100% dos tumores são carcinomas transicionais, porém de 26 a 37% possuem diferenciação escamosa. A diferenciação escamosa apenas ocorre em tumores indiferenciados em humanos (OYASU, 1995).

Recentemente, estudos moleculares chegaram a conclusões interessantes. A inativação do gene p53 e pRb induz ao carcinoma *in situ* e invasivo e metastático de bexiga, ao passo que a ativação do H-ras em camundongos transgênicos causa hiperplasia urotelial e hiperplasia superficial e não invasiva. Portanto, existem evidências experimentais de que diferenças fenotípicas são causadas por distintos defeitos genéticos (YAO et al., 2004; MO et al., 2007).

Estudos realizados na tentativa de estabelecer credenciamento molecular do modelo de carcinogênese de bexiga de ratos e camundongos induzida pelo BBN constataram a expressão de oito genes homólogos nas três espécies, principalmente quando se compararam carcinomas de bexigas invasivos em humanos (WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008).

Em que pesem as diferenças citadas, os modelos de carcinogênese de ratos e camundongos com o BBN são os mais amplamente co-

nhecidos e estudados. Curiosamente, os dois modelos se completam: em rato, ele se manifesta em seu fenótipo papilar superficial e, em camundongos, ele se manifesta intraepitelial como carcinoma *in situ*, invadindo a parede precocemente. Essas duas vias de transformação neoplásica de bexiga são observadas no homem. Atualmente, esses são os modelos de carcinogênese química mais utilizados em pesquisa para avaliação de produtos e fármacos na carcinogênese vesical.

O índice de carcinogênese: a ideia

A ideia surgiu quando iniciamos o estudo histopatológico das bexigas dos animais submetidos à carcinogênese pelo BBN. Compreendemos, naquele momento, o significado literal do diagrama da histogênese da carcinogênese de bexiga de roedores proposto por Oyasu, em 1995, (baseado em dados e estudos de Cohen, 1985, Kunze et al., 1976 e Oyasu et al., 1987). A exuberância e a multiplicidade de lesões em vários estágios da carcinogênese encontradas em uma só bexiga impressionavam e deixavam claro o árduo trabalho que teríamos pela frente. A pergunta era: como transformar toda informação obtida da análise histopatológica destas múltiplas lesões em um número que expressasse o estágio de carcinogênese alcançado por bexiga, para que pudéssemos comparar os grupos de forma mais clara e objetiva? O Índice de Carcinogênese (IC) surgiu, então, da necessidade de simplificar os dados para que se pudesse, de forma mais sintética e cristalina, avaliar a evolução da carcinogênese no interior da bexiga de cada animal e que se tornasse possível comparar os grupos utilizando apenas um número, que não os parâmetros habituais, tais como incidência, multiplicidade, invasão, atipia e diferenciação.

Foi assim que surgiu a ideia de elaborar um sistema de escores, para cada lesão vesical, de forma progressiva, com enfoque em aspectos da histogênese da carcinogênese de bexiga de roedores proposta por Oyasu (1995), propondo um cômputo final, que seria, então, o Índice de Carcinogênese. Esta ideia foi amplamente aceita pelo patologista que nos orientava na época (professor Paulo Roberto Carvalho de Almeida)

e que nos ajudou a implementá-la. Para esse propósito foram então criados escores progressivos para cada fase evolutiva da carcinogênese. A palavra escore vem da língua inglesa e quer dizer pontuação. O escore de desempenho padrão, por exemplo, é útil para comparar a posição de um indivíduo dentro de um grupo ao qual pertence. Na verdade, escores são números desprovidos de unidades de medidas. São convencionados e criados a partir de observações e análises prévias detalhadas. O IC é a representação numérica da lesão na bexiga cujo fenômeno neoplasia está no seu ápice, ou melhor, o IC nada mais é que o número que expressa o atual estágio de carcinogênese de cada bexiga.

Própolis

A própolis é um produto elaborado por abelhas, sendo constituído por resinas colhidas de ramos, brotos e flores de plantas, que se localizam em torno da colmeia. A essas resinas são acrescidas secreções e enzimas salivares no interior das colmeias (MARCUCCI, 1996). Não se conhecem ainda os fatores que direcionam a abelha para uma espécie vegetal, embora existam estudos sugerindo que a mobilização se dá por diferentes substâncias voláteis produzidas pela planta atrativa ao inseto (TEIXEIRA et al., 2005).

As propriedades físicas da própolis, tais como a cor, o sabor e o aroma, bem como suas propriedades químicas, variam de acordo com as características fitogeográficas da região e do tipo da espécie de abelha que a habita e seu alcance, geralmente cerca de 4 a 5km, em torno da colmeia, em se tratando de *Apis mellifera* (MENEZES, 2005; SALATINO et al., 2005). A cor da própolis possui variações sempre relacionadas com a vegetação de entorno à colmeia, podendo ser negra, amarela, marrom, verde ou vermelha (DAUGSCH et al., 2006; TRUSHEVA et al., 2006; ALENCAR et al., 2007). A composição da própolis também varia sazonalmente e pelas reservas de pólen e mel na colmeia. A diferença de composição química traz como resultado múltiplas atividades farmacológicas, principalmente quando provenientes de regiões em que o clima é tropical, onde a vegetação tem maior

abundância em espécies, quando comparadas a outras em que o clima é temperado (BANCOVA; CASTRO; SFORCIN et al., 2000; CASTRO et al., 2007).

A palavra própolis é de origem grega: pro - a favor de; e polis - cidade. A própolis é utilizada pelas abelhas para proteger as colmeias contra variações térmicas e invasão de micro-organismos, tornando o local asséptico para a postura de ovos. Insetos e pequenos animais têm sido encontrados recobertos pela própolis no interior de colmeias, mumificados e mantendo-se em perfeito estado de conservação. Essa propriedade foi objeto de observação dos antigos egípcios: existem descrições de que sacerdotes egípcios embalsamavam corpos com a própolis (1700 a.C.). Assírios, gregos, romanos e incas também fizeram uso da própolis para tratamento de doenças (PEREIRA; SEIXAS, 2002).

A própolis foi utilizada por médicos militares em ferimentos durante a guerra Anglo-Boer, na África do Sul, nos anos de 1880 a 1902. Na Segunda Guerra Mundial, Khandros, na cidade de Sveerdlovsk, administrou própolis em pacientes cirúrgicos para a cicatrização de feridas (IOIRISH, 1981).

O processo de industrialização e o consumo da própolis como um produto natural foram importantes para que pesquisadores iniciassem a identificação dos compostos e o estudo de seus efeitos farmacológicos. No XX Congresso Internacional de Apicultura, em Bucareste, em 1965, Adelina Derevic, Popescu e N. Popescu (apud IOIRISH, 1981) apresentaram um relatório sobre propriedades experimentalmente demonstradas em cobaias, na cicatrização em queimaduras, ação regenerativa e protetora sobre os tecidos, e apontou um composto do grupo de flavonoides, dentre as quais a galangina, como sendo o responsável por essas ações benéficas. Na década de 1970, na Europa, Lavie e Popravco (apud MARCUCCI, 2006) identificaram a presença de flavonoides na própolis, tendo comparado sua composição com exudatos de choupo e bétula naquela região.

Quando se trata de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos de fontes vegetais são divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e os ácidos fenólicos. Essa diferença é importante quando se compara

com a própolis europeia, cujo teor de flavonoides é mais expressivo que o de ácidos fenólicos. Com a própolis brasileira ocorre o inverso, ou seja, existe um predomínio de ácidos fenólicos em relação aos flavonoides, muito embora, no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, os flavonoides já comecem a aparecer em maior concentração, já que o clima daquele estado se assemelha ao de zonas temperadas da Europa, e as fontes vegetais parecem ser bem semelhantes (MARCUCCI, 2006).

Até a década de 1990, os trabalhos publicados sobre a utilização da própolis em geral eram provenientes de países da Europa Oriental. A partir de então, o Japão vem assumindo essa liderança, tendo depositado 43% das patentes referentes a esse estudo com síntese de substâncias bioativas, principalmente a partir da própolis brasileira, sendo seu principal importador (PEREIRA; SEIXAS, 2002).

Na revisão da literatura, foram encontrados vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, confirmando ou sugerindo atividades: antimicrobiana, dentre elas antibacteriana (GRANGE; DAVEY, 1990; AGA et al., 1994; LANGONI et al., 1996; BIANCHINI; BEBENDO, 1998; KUJUMGIEV; TSVETKOVA; SERKEDJIEVA et al., 1999; KONISHI; CHRISTINE; SAWAYA, 2000; PINTO; FARIA; MESSAGE, 2001; MARCUCCI et al., 2001; HEGAZI; HADY, 2002; KATIRCIOGLU; MERCAN, 2006; SILVA et al., 2006; TOSI et al., 2007; MOHAMMADZADEH et al., 2007; MELLIOU; ESTRATIS; CHINO, 2007; SALOMÃO et al., 2007); antifúngica (AGA et al., 1994; LANGONI et al., 1996; KUJUMGIEV et al., 1999; KONISHI; CHRISTINE; AWAYA, 2000; SFORCIN et al., 2001; MURAD et al., 2002; HEGAZI; HADY, 2002; VARGAS et al., 2004; SAWAYA et al., 2004; SONMEZ et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; KATIRCIOGLU; MERCAN, 2006; MOHAMMADZADEH et al., 2007; MELLIOU; ESTRATIS; CHINO, 2007; SALOMÃO et al., 2007); antivirótica (AMOROS et al., 1992; KUJUMGIEV et al., 1999; PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; HULEIHEL; ISANU, 2002; GEKKER et al., 2005); anti-*Helicobacter pylori* (BANSKOTA et al., 2001); atividade antitripanossoma (MARCUCCI et al., 2001; PRYTZYK et al., 2003; SILVA FILHO et al., 2004; DANTAS et al., 2006; SALOMÃO et al., 2007; SALOMÃO et al., 2009); amebicida

(VURAL et al., 2007); anti-Leishmania (MACHADO; LEON; CASTRO, 2007); anti-inflamatória (IVANOVSKA et al., 1995; PARK; KIM; PARK, 1996; PARK; KAHNG, 1999, NAGAOKA et al., 2003; PAULINO et al., 2003; CARDILE et al., 2003; BLONSKA et al., 2004; WOO et al., 2005; PAULINO et al., 2006; RAMOS; MIRANDA, 2007); cicatrizante (FUNARI et al., 2007); propriedade imunomoduladora (DIMOV et al., 1991; DIMOV et al., 1992; IVANOVSKA et al., 1995; ORSI, et al., 2000; SFORCIN, 2002; ORSOLIC; BASIC, 2003; ORSOLIC et al., 2004; ORSOLIC; BASIC, 2005; SFORCIN; OSRSI; BANKOVA, 2005; DANTAS et al., 2006, FISCHER, CONCEIÇÃO et al., 2007); propriedade antioxidante (VOLPERT; ELSTNER, 1993; SHARMA et al., 1997; MORENO; ISLÃ; SAMPIETRO, 2000; BANSKOTA et al., 2000; ISLA et al., 2001; BANSKOTA et al., 2001; NAGAI et al., 2003; SIMÕES GREGÓRIO et al., 2004; TAMER et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; OKUTAN et al., 2005; SHIMAZAWA et al., 2005; FULIANG et al., 2005; OGETURK et al., 2005; INOKUCHI et al., 2006; SILVA et al., 2006; NAKAGIMA et al., 2007; JASPRICA et al., 2007; TURKYLMAZ et al., 2007); atividade antidiabetes (OKUTAN et al., 2005; FULIANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002; ZAMAMI et al., 2007); atividade neuroprotetora (SHIMAZAWA et al., 2005, INOKUCHI et al., 2006; NAKAGIMA et al., 2007); atividade hepatoprotetora (SHARMA et al., 1997; BANSKOTA et al., 2000; BANSKOTA et al., 2001; EL-KHATIB; AGHA; MAHRAN, 2002); atividade anti-hipertensiva (MISHIMA et al., 2005); atividade relaxante em traqueia (PAULINO et al., 2002); atividade analgésica (PAULINO et al., 2003; PAULINO et al., 2006); efeito radioprotetor (ORSOLIC et al., 2007; BENKOVIC et al., 2008); atividade cicatrizante na úlcera gástrica (BARROS et al., 2007); ativação de receptores de estrogênio (SONG et al., 2002); atividade em pancreatite experimental (TURKYLMAZ et al., 2007); inibição de ativação plaquetária (HSIAO et al., 2007); inibição de tumores (BANSKOTA et al., 2002; SUZUKI et al., 2002; ORSOLIC; BASIC, 2003; LEE et al., 2003; WOO et al., 2004; ORSOLIC; KOSALEK; BASIC, 2005; ORSOLIC et al., 2005; ORSOLIC; BASIC, 2005; MISHIMA et al., 2005; BÚFALO; CANDEIAS; SFORCIN, 2007;

WENG et al., 2007; BENKOVIC; KNEZEVIC; BRONZOVIC, 2007; HERNANDES et al., 2007; AWALE et al., 2008); inibição da carcinogênese (RAO et al., 1993; RAO et al., 1995; MITAMURA et al., 1996; NAGASAWA, 1996; HUANG et al., 1996; HIROSE et al., 1997; JENG et al., 2000; KIMOTO et al., 2001; BORRELI et al., 2002; SUGIMOTO et al., 2003; OZKUL et al., 2005; ORSOLIC et al., 2005; atividade na metagênese (EROGLU; TATLISEN; OZKUL, 2004); inibição da angiogênese inflamatória (SONG et al., 2002; HEPSEN; ER; ÇEKİÇ, 1999); inibição de angiogênese tumoral (AHN et al., 2007; JUNG et al., 2007; KUNIMASA et al., 2009).

No início do século XXI, pesquisadores da Unicamp (Universidade de Campinas) avaliaram amostras de própolis coletadas em diversas regiões brasileiras, com exceção da região norte, na tentativa de classificar a própolis brasileira, segundo suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Foi possível classificar 12 grupos de própolis distintos: cinco na região sul, seis na região nordeste e um na região sudeste. A maior diversidade ocorreu na região nordeste. Todas exibiam excelente ação antioxidante, exceto dois grupos da região nordeste (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000).

Em 2006, a professora Cristina Marcucci, da Uniban (Universidade Bandeirante de São Paulo) desenvolveu um método para tipificar a própolis brasileira na tentativa de padronizar a própolis.

A tipificação trata-se de processo químico de identificação e quantificação dos compostos químicos majoritários de amostras de própolis, baseando-se na presença de marcadores já previamente identificados e selecionados como próprio da composição química da própolis brasileira, empregando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (MARCUCCI, 2006).

Esse perfil de estudo dos componentes majoritários foi obtido através de investigação de várias amostras, empregando análise química de própolis brasileira proveniente da região sul, sudeste e centro-oeste, para controle de qualidade, com a finalidade de utilizar a própolis tipificada pela indústria farmacêutica, permitindo maior incentivo para pesquisas brasileiras sobre suas ações farmacológicas, papel que vem sendo desempenhado de forma ostensiva pelo Japão.

Os flavonoides identificados na própolis brasileira foram o canferide (5, 6, 7 trihidroxi - 3,4' dihidroxiflavona) aromadendrina - 4 - metil éter, pinobanksina, crisina e galagina.

Os ácidos fenólicos mais comumente encontrados foram ácidos p-cumáricos (p- cum) prenilados, ácido 3 - prenil - 4 - hidroxicinâmico (PHCA), 9-E e 9-Z-2,2 - dimetil - 6 - carboxietinil - 8 - prenil - 2H - 1 - benzopirano (DCBEN), ácido 3,5 - diprenil - 4 - hidroxicinâmico (DHCA) e ácido 2,2 - dimetil - 8 - prenil - 2H - 1 - benzopirano - 6 - propenoico (DPB), vanila (G1), 3 - metoxi - 4 - hidroxinamaldeído (G2), 2 - [1-hidroximetil] - vinil - 6 - acetil - 5 - hidroxicumarano (I), e os ainda desconhecidos, isolados pela professora Marcucci: H, K, L1, L2 M e N (MARCUCCI, 2006).

Após análise cromatográfica pela CLAE (Cromatografia de Alta Eficiência), o perfil das amostras, baseado na identificação dos marcadores acima citados p-CUM, CAF (ácido cafeico), PHCA, DCBEN, DHCA, DPB, G1, G2 e I, estavam presentes em praticamente todas as amostras. O marcador principal é o ácido 3,5 - diprenil - 4 - hidroxicinâmico (DHCA), o Artepillin C®, registro de patente japonesa, que o sintetizou e o comercializou para tratamento de tumores.

Baseados nos compostos isolados, a própolis brasileira foi então classificada em 4 tipos BRG, BRP (PR), BRP (MG/SP) e BRPG.

A BRG aparece nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com marcadores G1, G2 e I; o BRP (PR), com marcadores DCBEN, DPB, PHCA; o BRP (SP/MG) que aparece nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, com os marcadores CAF, DHCA e p-CUM. Observa-se que o DCBEN está presente apenas no tipo BRP (PR). O BRPG é uma interface entre os tipos BRP (PR) e BRG e contém compostos dos dois grupos (MARCUCCI, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos de própolis quanto aos seus marcadores e distribuição geográfica.

Tipo de Própolis	BRG	BRP (PR)	BRP (SP/MG)	BRPG (interface)
Locais de coleta	PR, SC, RS	PR	SP, MG, RJ	PR, SC, RS
Marcadores	G1, G2 e I	DCBEN, DPB, PHCA	CAF, DHCA, p-CUM	G1, G2, I, DCBEN, DPB, PHCA

Fonte: tabela elaborada pelos autores com dados provenientes de Marcucci, 2006.

A própolis verde é uma própolis encontrada na região sudeste e sul do Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Ela é assim denominada pela sua cor verde e tem sido objeto de estudo no Japão e em países da Europa Central, como a Croácia e a Bulgária. Esta cor se deve a pigmentos presentes em material coletado pela abelha ao visitar a *Baccharis dracunculifolia*, um arbusto nativo da região que pode atingir até quatro metros de comprimento. A *Baccharis dracunculifolia* é conhecida como alecrim do campo e vulgarmente denominada de vassourinha, pelo costume local de utilizá-la para confecção de vassouras para limpeza de quintal.

Existem duas plantas, uma feminina e outra masculina, e, apesar de diferenças entre os compostos químicos exalados, elas são visitadas igualmente pelas abelhas.

O número de compostos identificados em própolis dos estados de Minas Gerais e São Paulo pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa com espectrometria de massa confirmou que a resina de espécie vegetal de *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte de resina para elaboração das própolis produzidas nesses estados (ALENCAR et al., 2005).

Existem pelo menos 500 espécies de *Baccharis* das quais 120 são brasileiras e a maioria delas é nativa do continente sul-americano. O artepillin C ácido 3,5 – diprenil - 4 – hidroxicinâmico foi isolado pela primeira vez na própolis verde e relatado como composto antimicrobiano, em 1994, no Japão (AGA et al., 1994), e patentado pela indústria farmacêutica japonesa Hayshibara Farmacêutica Co Okayama

Japão. A seguir, o artepillin C foi isolado em brotos tenros de *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2004). Daí por diante ele tem sido isolado em *Baccharis grisebachii*, na Argentina, e outras *Baccharis ssp* no Brasil. A própolis brasileira é internacionalmente conhecida como própolis verde. Esse nome é utilizado pelos japoneses para sua rápida identificação no processo de comercialização. A cor é dada pela drupamina, artepillin C e bacarina e mais fragmentos de *Baccharis dracunculifolia*. No entanto, existem própolis no estado do Paraná que não são própolis verde e possuem artepillin C.

Extração da própolis

Um dos grandes desafios para o estudo farmacológico da própolis em experimentação é a complexidade e diversidade de sua composição. A maioria desses compostos é insolúvel em água e o que se verifica é uma tendência para a extração em solução alcoólica.

Existem vários métodos de extração utilizando álcool, éter e água. Cada um destes métodos é importante para a separação das substâncias que possuem interesse farmacológico. A escolha do método de extração está ligada à solubilidade do composto de interesse e ao destino farmacológico deste composto. A maioria dos trabalhos experimentais utiliza o extrato alcoólico. Entretanto, se se considerar, por exemplo, que a sua aplicação se destina à pesquisa farmacológica em modelos experimentais no olho, a extração em álcool deverá ser reavaliada.

Uma extração de própolis solúvel em água tem o inconveniente de não extrair substâncias de interesse farmacológico insolúveis em água. No entanto, existe um método de extração da própolis em água que vem sendo estudado. É o WSDP (*Water Soluble Derivative Propolis*), um método patenteado que, desde 1987, é utilizado por pesquisadores da Croácia e Bulgária. O método consiste na extração, em três vezes, em etanol. Após a filtração, é deixado evaporar. Após a evaporação, o produto resinoso é extraído em *L*-lisina a 8%, na proporção de 10 gramas desse resinoso material para 150ml de solução de *L*-lisina a 8%, na temperatura entre 50 e 60° centígrados e, a seguir, o

produto acondicionado a 4º centígrados é liofilizado. Vários centros de pesquisa na Europa utilizam a própolis de sua região e também a própolis verde e vermelha do Brasil, extraída em *L*-lisina, principalmente na investigação de seus efeitos na carcinogênese em modelos animais (NICOLOV et al., 1987; KRELL, 1996; ORSOLIC et al., 2007; BENKOVIC et al., 2008).

O EXPERIMENTO

Este trabalho foi desenvolvido sob aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, em 23 de maio de 2006 (Protocolo número 03/06), estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais

Foram utilizadas 125 ratas albinas da linhagem wistar, classe *mammalia*, ordem rodentia, família murídea, gênero *Rattus*, espécie *novergicus*, com cinco semanas de idade, pesando em média 77 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, tendo sido avaliadas em quarentena por duas semanas após o desmame.

Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 41 x 34 x 16cm, alojados em número de cinco animais por gaiola, forradas com maravalha branca de pinho, autoclavada (Basequímica - SP). Durante o experimento, os animais permaneceram no Biotério da Pós-Graduação da Cirurgia, recebendo ração basal peletizada (Biobase - SC Bio-tec “9301”) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em temperatura em torno de 22 graus, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, com sistema contínuo de exaustão.

Condições de manutenção do biotério e proteção individual e ambiental

O biotério foi preparado para o experimento segundo as recomendações da OMS (Organização Mundial de Saúde), em termos de uso de materiais, manejo dos animais e proteção para técnicos, frequentadores do biotério e meio ambiente (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1979; 1982).

Na porta de entrada do biotério, foram colocados máscara respiratória para gases (ADVANTAGE 200 CA8558 MAS, com filtros GME-H CL-1 218157 MSA), material para antisepsia e informações de advertência para o uso obrigatório de máscara e permanência restrita no ambiente.

Pictogramas informando perigo de toxicidade e de risco de explosão, bem como de EPI (Equipamento de Proteção Individual) foram fixados em lugares estratégicos, em vasilhames, frascos, refrigeradores e prateleiras no biotério.

O técnico responsável pela higienização e limpeza do biotério recebeu treinamento exaustivo de como se paramentar, utilizar máscaras respiratórias, procedimentos de rotina no manuseio de animais e gaiolas, bem como todo material indispensável para sua proteção individual: luvas de látex, luvas de borrachas, máscaras respiratórias para gases - ADVANTAGE 200 CA8558 MSA, com filtros GME-H CL-1 218157 MSA, óculos protetores, gorro, botas de borracha, pijamas de polietileno, aventais impermeáveis, aparelhos e cremes para barbear.

Para higienização das gaiolas, foram fornecidos NAOH (hidróxido de sódio) a 10%, vassouras, espátulas, baldes, forros de polietileno, armário e cabides.

Todos os envolvidos no experimento receberam treinamento para manipulação dos animais e proteção individual, como pijamas, macacões, aventais, máscaras respiratórias (ADVANTAGE 200 CA8558 MAS, com filtros GME-H CL-1 218157 MSA), gorros, propés e óculos protetores, e foram acompanhados direta e diariamente em suas atividades pelo pesquisador.

O volume de água ingerido por grupo de cinco animais foi avaliado previamente por um grupo piloto paralelo e projetado para uma mamadeira de polipropileno de 250ml com bico de aço acoplado por uma tampa de borracha. A escolha teve como critérios evitar perdas, derramamento, acidentes de contaminação ambiental e controle absoluto sobre o volume ingerido. As mamadeiras foram trocadas a cada dois dias e todas foram revestidas de folhas de papel alumínio (para impedir a degradação da solução de carcinógeno pela luz) e protegidas com capas de poliestireno, improvisadas, por metade de uma garrafa de refrigerante de dois litros, impedindo, assim, que os animais roessem o alumínio. As mamadeiras receberam cuidados especiais por 14 semanas, sendo o pesquisador o único responsável pela manipulação destas. A cada duas semanas, bicos e mamadeiras foram colocados em solução de soda cáustica a 10% por 90 minutos e lavados em água corrente. Toda solução de carcinógeno a ser desprezada, previamente, foi tratada, acondicionada em reservatório, sendo neutralizada com solução de permanganato de potássio em ácido sulfúrico, conforme recomendado pelo manual da OMS (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER, 1982), e só então desprezada em esgoto comum. Ao final de 14 semanas, as mamadeiras e os bicos foram encaminhados para incineração pela firma especializada, sendo estas substituídas por mamadeiras de vidro.

As maravalhas das gaiolas foram trocadas três vezes por semana e acondicionadas em duplos sacos de polietileno, sendo encaminhadas para incineração por empresa especializada. A higienização das gaiolas foi realizada após cada troca de maravalha, com solução de NaOH a 10% imersas pelo período de duas horas e lavada em água corrente.

A administração oral e injetável de substâncias em todos os animais foi realizada em sala anexa ao biotério, e o transporte das gaiolas foi realizado sob completa proteção individual.

Todo o espaço físico do laboratório e biotério foi sinalizado com advertências por cartazes, com orientação sobre o risco de contaminação e procedimento adequado na prevenção de acidentes.

Durante o tratamento dos animais, com sondagem esôfago-gástrica, ou injeção subcutânea, todos os envolvidos no experimento utili-

zaram roupas especiais para o procedimento: pijamas de polietileno, macacões, aventais, máscaras respiratórias, gorros, propés, óculos protetores, luvas de látex, luvas de borracha, sendo acompanhados diretamente pelo pesquisador. As mesas de suporte da gaiola e da balança de pesagem foram devidamente protegidas de excreções dos animais durante o procedimento, sendo forradas com folhas de polietileno e jornal, diariamente. Todo o lixo foi enviado para incineração.

As substâncias utilizadas

O BBN

Foram utilizados cinco frascos de 25 gramas cada um (total de 125 gramas) de BBN (n – butil – n {4 – hidroxibutil} nitrosamine), adquirido na TCI America 9211 N Harbogate Street Portland OR 97203. Número do catálogo B0938. Fórmula química: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{N}[(\text{CH}_2)_4\text{OH}]\text{NO}$. CAS (*Chemical Abstract Service*) 3817-11-6.

Os frascos foram armazenados a 4° centígrados no Laboratório de Cirurgia Experimental. Cada frasco de carcinógeno contendo BBN na concentração a 97% foi diluído gradativamente. Primeiro, em solução mãe, a 2,5%, acrescida de dez gotas de solução de Tween 80, em vidro âmbar de um litro. Essa solução foi conservada a 4° centígrados e rediluída a cada dois dias, a 0,05%, em volume calculado previamente para consumo imediato. Todo o procedimento de manipulação do carcinógeno foi realizado sobre fluxo laminar BII, com exaustão completa e paramentação do pesquisador com pijama de polietileno sobre macacão impermeável em peça única e pijama cirúrgico, máscaras respiratórias para gases (ADVANTAGE 200 CA8558 MAS, com filtros GME-H 218157 MSA), gorros, protetores, botas de borrachas, propés, luvas de látex e luvas de borrachas, segundo normas internacionais estabelecidas pela OMS para manipulação de nitrosaminas, bem como no MSDS (*Material Safety Data Sheet*) da substância. Foram também estabelecidos protocolos para neutralização de carcinógeno puro, diluído, bem como para descontaminação em caso de acidentes ambientais e

humano, incluindo primeiros socorros (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER, 1979; 1982).

As soluções neutralizantes

A solução de ácido sulfúrico e permanganato de potássio (CASTEGNARO et al., 1982), cujo princípio de ação é de oxidação de nitrosaminas, foi manipulada na Farmácia Escola da Universidade Federal do Ceará e utilizada para descontaminação de vidros, instrumental, para casos de contaminação do fluxo laminar e derramamento acidental de carcinógeno puro ou diluído. O ácido sulfúrico concentrado foi diluído para 3 mols/l, adicionando-se ácido à água, nessa ordem, para evitar risco de explosão (reação extremamente exotérmica). A seguir, foi imersa em banho de água fria.

A solução de permanganato de potássio foi preparada na concentração de 0,3 mols. As duas soluções foram colocadas em frascos de vidro âmbar e mantidas junto ao fluxo laminar e no Laboratório de Cirurgia Experimental, como estabelecido no protocolo de segurança.

A solução de soda cáustica e alumínio INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEACH ON CANCER, 1979; (GANGOLLI, 1974) foi utilizada com o princípio de redução eletroquímica de nitrosaminas em aminas, para descontaminação de material de polipropileno, alumínio e inoxidável. A Solução de NaOH (125 g/litro) 12,5% foi acrescida de folha de papel alumínio picada (10 gramas por litro), no momento imediato ao seu uso. Essa solução necessita de cinco horas de imersão dos objetos para se obter a descontaminação.

O Celecoxibe

Celebra 200mg do Laboratório Pfizer.

Administrado nas doses de 30 mg/kg peso, via gavagem.

A L-lisina

Aminoácido com origem e procedência da Alemanha L-lisina cloridrato.

Lote 040309 (certificado de qualidade, em Anexo E).

Fórmula: $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ PM 182,65.

CAS- 657-27-2. Estrutura química na Figura 12.

Preparada em solução de H_2O destilada a 8% para extração de própolis. Administrada nas doses de 150 e 300 mg/kg/peso dia.

A extração da própolis verde em L-lisina

A própolis verde bruta, embalada a vácuo, foi coletada na cidade de Passa Quatro, MG, pelo produtor Francisco José Neto, residente na Avenida Salgado Scarpa, número 413, que também nos enviou exemplares da planta predominante em torno das colmeias, sendo identificada como *Baccharis dracunculifolia* (Figuras 2 e 3).



Figura 2 – A - Local da coleta em Passa Quatro, Minas Gerais (MG). B - Própolis verde *in natura* a vácuo. Fonte: Elaborada pelos autores.



Figura 3 – Vegetação em torno da colmeia em Passa Quatro (MG). Arbustos de *Baccharis dracunculifolia*, entre outros.

Fonte: Foto da Colméia registrada pelo fornecedor.

A própolis foi coletada nos meses de setembro e outubro de 2005, evitando os meses de inverno com baixas temperaturas na região.

A própolis foi extraída seguindo princípios da patente para extração de própolis solúvel em água (*WSDP - water soluble derivative própolis*) – depositada em Sofia, Bulgária, sob registro nº 79903 (NICOLOV et al., 1987), com algumas modificações, no Laboratório de Biocatálise de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação e orientação da professora doutora Telma Lemos, pelo doutor Irineu Albuquerque. A cópia da patente (NICOLOV et al., 1987) foi gentilmente enviada pelo professor Nada Orsolich, do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade de Zagreb, na Croácia, pesquisador que estuda a própolis brasileira. A patente, em búlgaro, foi traduzida para o português por Nina Gueorguieva Grigorovauma, funcionária búlgara do consulado da Bulgária no Brasil (RJ).

A própolis foi fragmentada em porções menores e colocada em frasco contendo álcool etílico, nele permanecendo por 15 dias. Foram realizadas mais duas extrações em álcool etílico. O extrato alcoólico foi levado à concentração em “banho-maria” por três dias. O extrato concentrado foi submetido a processo de particionamento líquido-líquido. Inicialmente, com éter

de petróleo, para extração dos ácidos graxos e, a seguir, com éter etílico para extração das substâncias mais polares. Este extrato foi levado à concentração em “banho-maria” por cinco dias. Uma solução *L*-lisina a 8% contendo 1500ml foi aquecida em “banho-maria” a uma temperatura entre 51 e 60° centígrados. A essa solução foram acrescentados 100 gramas de extrato de própolis concentrado, mantendo a solução em movimentos rotatórios, continuamente, pelo período de 30 minutos. Assim feito, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e conservada por 24 horas na temperatura de 4° centígrados. O extrato da própolis/lisina foi filtrado, imediatamente levado ao freezer (desprezando-se o resíduo), sendo então liofilizado em liofilizador de bancada. O produto final resultou em pó de cor amarelo claro, de odor adocicado, lembrando mel. A própolis liofilizada foi acondicionada em frascos estéreis, hermeticamente fechados, em pequenas porções, e colocados em refrigeração a 4° graus centígrados. A cada 15 dias, após pesagem dos animais, a quantidade para cada grupo foi recalculada, pesada em balança digital, e a porção diária para uso foi acondicionada em *ependorfs*, e estes colocados em frascos vedados e sob refrigeração (Figuras 4 e 5).

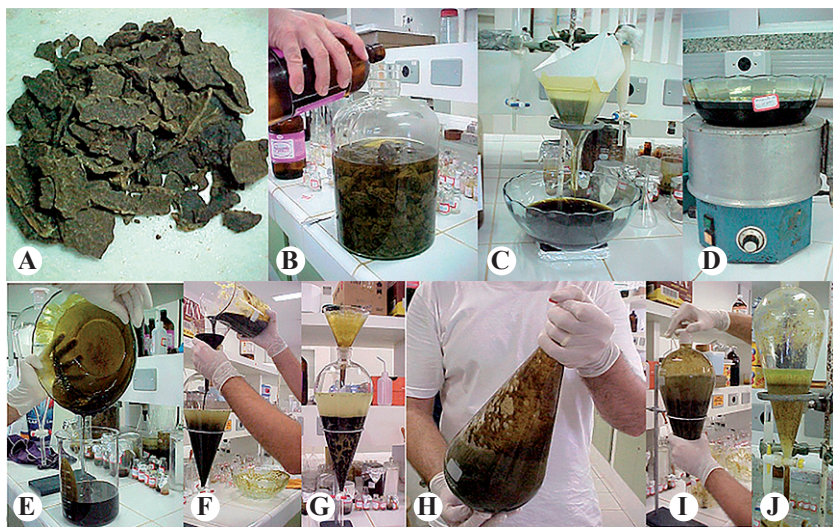


Figura 4 – Extração da própolis WSDP: A – Própolis bruta; B e C – Extração em álcool etílico; D – Concentração em “banho-maria”; E, F, G, H, I, J e L – Extração em éter de petróleo. Fonte: (DORNELAS et al., 2012b).

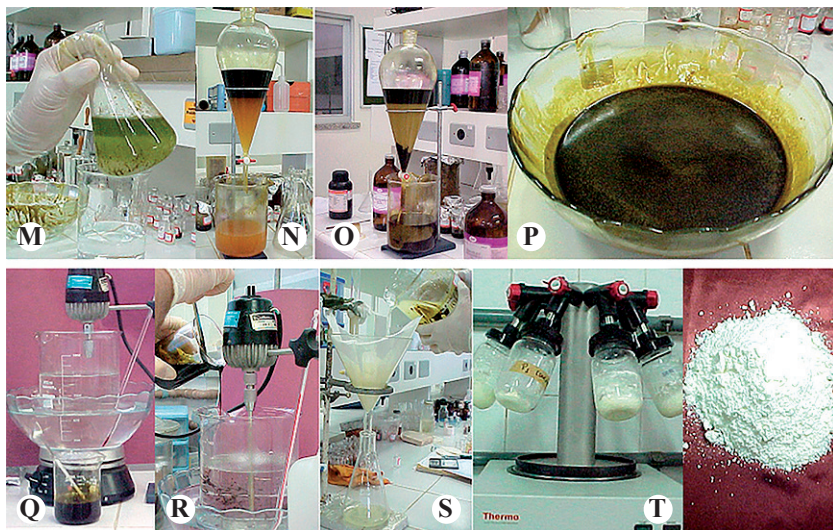


Figura 5 – Extração da própolis WSDP continuação: M e N – Extração em éter etílico; O – Concentração e evaporação do extrato de própolis; P, Q e R – Extração em L- lisina; S – liofilização; T– Própolis liofilizada.

Fonte: (DORNELAS et al., 2012b).

Tipificação e quantificação da própolis

A própolis (liofilizada e na forma *in natura*) foi encaminhada para tipificação, com análises desenvolvidas em um cromatógrafo líquido com rede de fotodiodos e injetor automático. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel água-ácido fórmico (Merck), (95:5, solvente A) e metanol grau cromatográfico (Merck) (solvente B). A eluição foi desenvolvida em um fluxo de 1ml/min utilizando-se um gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção efetuada em comprimentos de onda de 280 e 340 nm. Empregou-se um *softwaer* apropriado para interpretação e quantificação dos resultados obtidos (TIP®). O processo incluiu a entrada de dados em uma planilha para a quantificação das substâncias identificadas pela CLAE e estabeleceu uma tipagem da amostra pela quantidade de cada componente próprio da composição química da própolis brasileira. Esse processo de tipificação foi desenvolvido e

realizado pela professora Maria Cristina Marcucci, da Universidade Bandeirante (Uniban), na cidade de Campinas, SP. Paralelamente, foram isoladas outras substâncias da própolis no Laboratório de Química Orgânica da UFC.

Teste de atividade antioxidante

Amostras de produto da própolis verde solúvel em água (*Water Soluble Derivative of Própolis* (WSDP), liofilizada, e da própolis *in natura* foram avaliadas quanto ao potencial antioxidante *in vitro* (HEGAZI; HADY, 2002), no Laboratório de Química Orgânica da UFC, através do método do sequestro de radical DPPH (1,1-difenil-2 picril-hidrazil). As amostras analisadas de própolis e das substâncias isoladas foram diluídas em três concentrações de 1000, 250, 62,5 ppm, que foram dissolvidas em 1.0ml de etanol e adicionadas a uma solução etanólica de DPPH (1,0ml), na concentração de $60\mu M$; adicionou-se em uma cubeta cerca de 1ml de DPPH e 1ml de etanol; testaram-se substâncias em diferentes concentrações. Foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 520nm em espectrofotômetro de UV, no tempo inicial e após 30 minutos. A percentagem de inibição foi feita por comparação da absorção da solução contendo amostra, em relação a uma solução controle de DPPH sem amostra. Como padrões positivos de referência, utilizaram-se a vitamina C e Trolox, um antioxidante sintético similar à vitamina E.

Os resultados foram expressos em porcentagens de capacidade de sequestrar ou reduzir o DPPH, dados em porcentagem de atividade antioxidante, calculados pela fórmula $I = 1 - \left(\frac{A_{amostra}}{A_{branco}} \right) \cdot 100$ e IC50, calculados pela regressão linear de gráficos dados pela concentração em mg/ml (eixo x) e pela porcentagem de atividade antioxidante (eixo y), calculada na equação de Mensor:

$$\%A = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right) \cdot 100.$$

Delineamento do experimento

Foram utilizadas 125 ratas com cinco semanas de idade, distribuídas em 14 grupos (Tabela 3). As 125 ratas wistar foram distribuídas em grupos: I, IIA, IIB, III, K, L M N, X, XI, XII e XIII, nesta ordem. Os grupos de I a X receberam BBN a 0,05% por 14 semanas em água de beber. O grupo I foi tratado com própolis ig 150mg/kg/peso, por 44 s, iniciado 30 dias antes do início do BBN. Os grupos IIA, III foram tratados com própolis (150mg/kg/peso), por 40 s, sc e ig, respectivamente, iniciada, simultaneamente, com o BBN. Na 32ª s, os animais dos grupos L, M e N, foram tratados ig com: *L*-lisina (300mg/kg/peso), celecoxibe (30mg/kg/peso) e própolis (300mg/kg/peso), respectivamente, até a 40ª s. Os grupos que receberam apenas BBN (IIB e K) foram tratados com água, via sc e oral, respectivamente, por 40 s. Os grupos: XI, XII e XIII receberam, nesta sequência, própolis (150mg/kg/peso), *L*-lisina (150 mg/kg/peso) e água ig por 40 s (detalhes na Figura 6). Os grupos K, L, M e N foram utilizados para estudo de angiogênese tumoral (DORNELAS et al., 2012b).

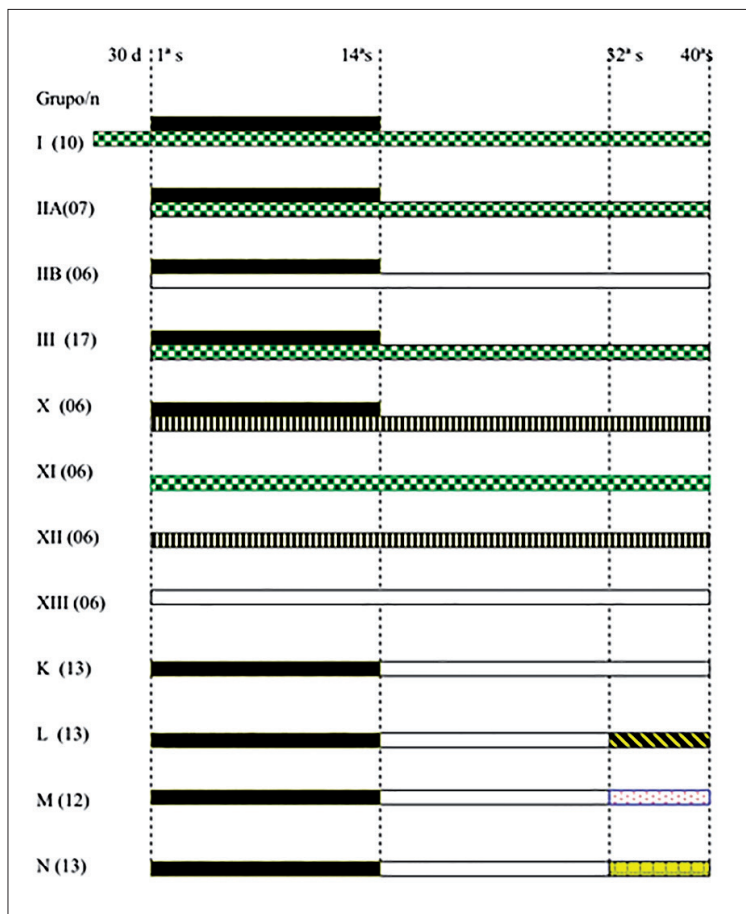









Figura 6 – Delineamento do experimento.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Própolis (150mg/kg/peso) 
 L-lisina (150mg/kg/peso) 
 BBN (0,05% água de beber) 
 celecoxibe (30mg/kg/peso) , H₂O 
 Própolis dose dupla (300mg/kg/peso) ,
 L-lisina dose dupla (300mg/kg/peso) 
 n – número de animais,
 d – dia
 s – semana

Administração intragástrica, dose única diária I, III, X, L, M, XI, XII, XIII.

Administração subcutânea, dose única diária IIA e IIB.

Estudo da macroscopia da bexiga fixada em formol

A bexiga foi distendida com formol tamponado a 10%, com ligadura de uretra e ureter bilateralmente. Assim foi fotografada em microscópio cirúrgico estereoscópico (DF VASCONCELLOS M90 VASCONCELLOS S. A.), acoplado a uma câmara de vídeo (HITACHI VCC -151), conectado a um computador, com sistema de captura de vídeo (PIXELVIEW PV TV304P) e imagens estáticas, com placa de captura e *software*, sob lentes de 10, 16, 25 e 40 vezes de aumento. O plano de fundo foi iluminado com negatoscópio, sendo registrados os vasos, seu calibre, distribuição, bem como aspectos à contraluz do conteúdo vesical e invasão de parede (Figura 19 AB). A bexiga foi aberta em plano coronal, dividindo a bexiga em metade ventral e metade dorsal. As lesões foram fotografadas (Figura 7), mapeadas e identificadas (Figura 8).

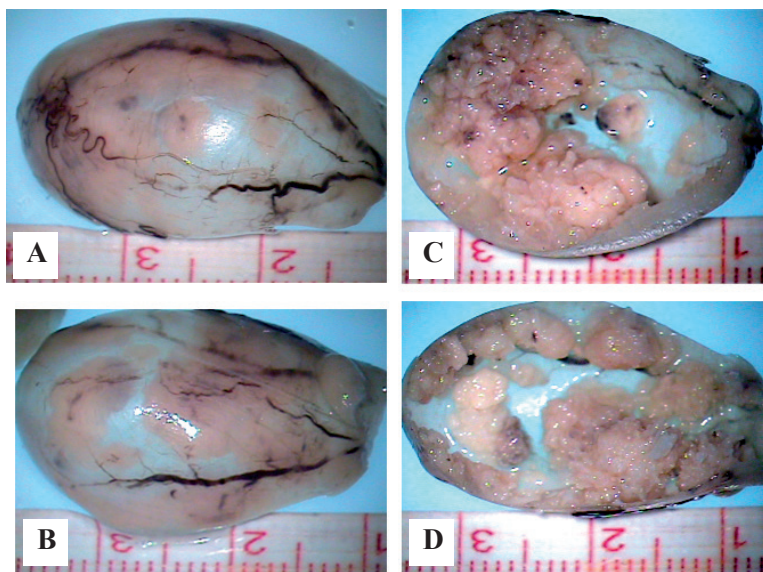


Figura 7 – Exame da bexiga: A e B - Bexiga fixada em formol a 10%, seccionada em plano coronal, parede ventral e dorsal. Na superfície externa (A e B), notam-se vasos proeminentes calibrosos, alguns espiralados, e na luz vesical; C e D - Observam-se múltiplas lesões papilares difusas, ocupando mais de 1/3 da parede - Grupo N - Rato 7. Fonte: Elaborada pelos autores.

Uma vez mapeadas, as lesões foram classificadas obedecendo à Classificação Internacional de Tumores do sistema urinário de ratos, publicada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 1992, com atualização (OYASU, 1995). Para a LBPM (Lesão de Baixo Potencial Maligno), foi acrescido o consenso da WHO/ISUP 2004 para humanos (*World Health Organization/ International Society of Urological Pathology*).

O Índice de Carcinogênese através de escores por lesão

Em virtude da característica multifocal das lesões vesicais, bem como da multiplicidade de lesões em diversas fases da carcinogênese em uma mesma bexiga, foram adotados critérios de avaliação, com sistema de escores, baseados no comportamento biológico do tumor no modelo experimental com BBN (OYASU, 1995), e em estudos prévios (BRYAN; COHEN, 1984; KUNZE; SCHAUER; SCHATT, 1976; OYASU et al., 1987) e foi criado o Índice de Carcinogênese (IC), que levou em consideração as diversas fases da carcinogênese, conforme se segue:

Para cada lesão histopatológica evolutiva sequencial foi estabelecido um escore de forma que sempre a lesão subsequente recebesse um escore inicial igual ao somatório máximo possível de ser obtido nas lesões anteriores, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Escore inicial para cada lesão histopatológica vesical.

Lesões histopatológicas	Escore inicial
Hiperplasia simples	0
Hiperplasia papilar	6
Hiperplasia nodular	6
Papiloma de células transicionais exofítico	12
Papiloma de células transicionais invertido	12
Lesão de baixo potencial maligno	15
Carcinomas	18

Fonte: Elaborada pelos autores.

Escores por lesão

Hiperplasia simples:

Escore inicial = 0; Acrescenta 0 a 3 (conforme o número de camadas de células): Leve (4 a 7 camadas) = 1 ;

Moderada (7 a 10 camadas) = 2; Severa (>10 camadas) = 3.

Atípias 0 a 3: Leve = 1; Moderada = 2; Severa = 3

Escore máximo: [Escore inicial (0) + número de camadas (3) + atípias (3)] = 6

Hiperplasia papilar ou Hiperplasia nodular:

Escore inicial = 6; Escore fixo da lesão = 3

Atípias (0 a 3): Leve = 1; Moderada = 2; Severa = 3

Escore máximo: [Escore inicial (6) + escore (3) + atípicas (3)] = 12

Papiloma exofítico e Papiloma endofítico:

Escore inicial = 12; Escore fixo = 3 (para ambas lesões)

Escore máximo: [Escore inicial (12) + escore (3)] = 15

Lesão de Baixo Potencial Maligno:

Escore Inicial = 15; Escore fixo = 3

Escore máximo: [Escore inicial (15) + escore (3)] = 18

Carcinomas:

Escore inicial = 18

Gradação histopatológica (máximo = 9);

Diferenciação: Bem = 1, Moderado = 2; Indiferenciado = 3

Atipia celular: Baixo grau = 1; Alto grau = 2 a 3

Número de mitoses: Até 10 = 1; 10 a 20 = 2; >20 = 3

Invasão: (máximo 6): Intramucosa = 1; Submucosa = 2; Muscular = 3; Serosa = 4; Peritônio = 5; Metástase = 6

Subtipos de lesões histopatológicas de carcinomas: (máximo 3)

Puro: CCT = 1; Escamoso = 3; Adenocarcinoma = 3

CCT com diferenciação e (outro tipo histológico)

Escamosa = 3; Glandular = 3; Escamosa/glandular = 3; Psudoglandular = 3

Misto (CCT e mais um tipo histológico no mesmo tumor)

Escamoso = 3; Adenocarcinoma = 3; Escamoso/adenocarcinoma = 3;

Escore máximo: [Escore inicial + (Gradação histopatológica x Invasão x subtipo de carcinoma)]

Após classificação, todas as lesões de cada bexiga foram introduzidas em tabelas individuais para cada bexiga (Apêndice A). A lesão que obteve o maior escore foi computada como índice de carcinogênese alcançado pela bexiga (Apêndice A). Uma vez analisadas todas as bexigas de um grupo, os índices obtidos foram introduzidos em tabelas individuais por grupo (Apêndice A).

Para avaliação da carcinogênese, também foram contabilizados os números de bexigas com lesões vesicais benignas e malignas: hiperplasias, papilomas, lesão de baixo potencial maligno LBPM (papilomas com atipias ou dúvidas quanto à invasão) e carcinomas.

Os critérios para avaliação do grau de atipias estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3 – Critérios para avaliação do grau de atipia.

Critérios	Baixo grau (1)	Alto grau (2 e 3)
Aumento de celularidade		
Hipercromasia nuclear	Se apresentar qualquer dos critérios.	2 Se mais de um critério ou se todos de leve a moderada intensidade
Nucléolo proeminente		
Pleomorfismo celular		
Pleomorfismo nuclear		3 Se todos de intensidade acentuada
Presença de mitose atípica		

Fonte: Elaborada pelos autores.

Além do índice de carcinogênese (IC) por escore, foram ainda realizados estudos da incidência de carcinomas, da multiplicidade de CCT de bexigas (número de tumores por bexiga) com avaliação do número total de tumores por bexiga e por grupo, da invasão de cada um destes tumores de seu grau de atipia celular.

Crítérios de exclusão para avaliação da carcinogênese: foram excluídos os animais que desenvolveram tumores em ureter e/ou pelve renal, animais vítimas de canibalismo da bexiga ou tumores com autólise intensa.

Todas as lâminas receberam código secreto desconhecido dos examinadores.

Os animais foram pesados a cada 15 dias, sendo realizada a curva de variação temporal de massa corporal. (A variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, calculada em função da massa corporal verificada no início do estudo, conforme a seguinte expressão:

$$\Delta MC = \frac{MC(S_i) - MC(S_0)}{MC(S_0)} \cdot 100, \text{ onde } MC(S_0) \text{ é a massa corporal}$$

basal, mensurada no início do estudo, e $MC(S_i)$ corresponde à massa corporal verificada numa dada semana i).

Exames de ultrassonografia

Todos os animais foram submetidos ao exame de ultrassonografia de bexiga. O procedimento foi realizado no Serviço de Radiologia do Hospital Universitário da UFC. Esse exame foi realizado na 31ª e na 40ª semana, após o início do carcinógeno, sob anestesia peritonial com ketamina e xilazina, nas doses de 80mg/kg e 8mg/kg peso, respectivamente. Após anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia abdominal e oclusão do meato uretral, com fio 30, com apenas um nó firme, evitando isquemia para impedir o esvaziamento vesical. Alguns animais, por insuficiência do enchimento vesical, foram submetidos à cateterização uretral, após rigorosa antisepsia com polivinilpirrolidona, utilizando-se de cateter de polietileno Angiocat 24 BD, sem agulha, a olho nu, com cuidado, levando em consideração o trajeto uretral paralelo ao canal va-

ginal, fazendo uma angulação cefálica a 6mm do meato. Ao penetrar na bexiga, a confirmação da posição ocorreu com a imediata eliminação espontânea de gotas de urina pelo cateter. Com uma seringa contendo água destilada estéril, a bexiga foi insuflada até a fácil palpação em região hipogástrica. A uretra foi ocluída com fio de algodão 30. As imagens foram obtidas em cortes transversais e sagitais, sendo medidas em seus maiores diâmetros. O procedimento foi realizado no aparelho de ultrassom PHILIPS, com sonda linear de 12 MHz sob gel (Figura 9).

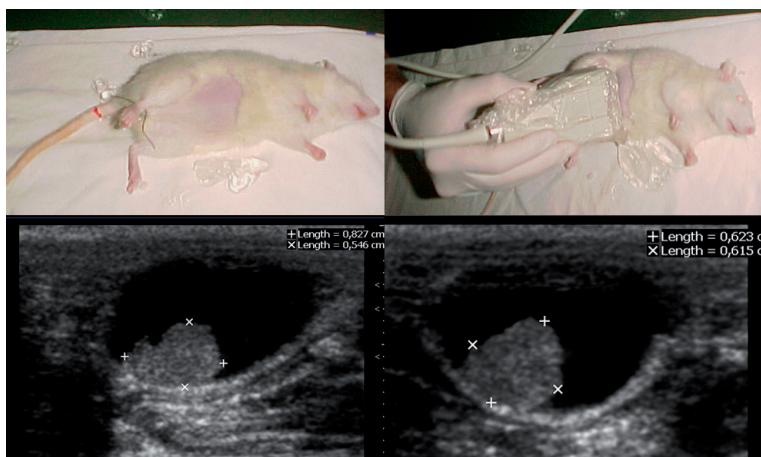


Figura 9 – Ultrassonografia **A** – Rata anestesiada preparada para ultrassonografia de bexiga; **B** – Sonda linear no abdome; **C** – Ultrassonografia: imagem vegetante tumoral projetando-se para o interior da bexiga cheia (janela acústica vesical). Medidas de seus maiores diâmetros (cortes transversal e sagital); Grupo M - Rato 3 - 40 semanas.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Eutanásia

Na 41ª semana após iniciado o carcinógeno, os animais foram então submetidos à avaliação de cavidade abdominal, coleta de sangue para exames bioquímicos, eutanásia e necropsia. Para tais procedimentos foram anestesiados com ketamina e xilazina nas doses 80mg/kg e 8mg/kg peso, respectivamente. Foi realizada incisão abdominal longitudinal mediana xifopubiana, interessando pele, subcutâneo e muscula-

tura, até a cavidade abdominal. Inventário da cavidade foi realizado metodicamente, iniciando pela bexiga, observando tamanho, mobilidade, aspecto da serosa, parede vesical, tumorações, aspectos macroscópicos de tumorações, consistência, invasão, vascularização, aderência, linfonodos. Rins e ureteres foram inspecionados em tamanho, cor, dilatações, tortuosidades, tumorações, bem como alças intestinais fígado, baço, estômago e retroperitônio. Após exame cuidadoso da cavidade abdominal, o colo vesical e ureteres foram então dissecados e ligados com fio cirúrgico 30. A seguir, o retroperitônio foi exposto com dissecação delicada de fascia anterior de aorta.

A tipificação da própolis

A Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE), com a quantificação e identificação dos marcadores em mg do composto/por grama de própolis bruta, foi realizada pela professora Cristina Marcucci, na Uniban, e evidenciou-se a presença do mais importante marcador da própolis verde, o artepillin C, com 13,60mg/g de própolis. Foram também identificados oito derivados do artepillin C na quantidade de 3,60mg/g. Os derivados são compostos cujas estruturas químicas foram identificadas e têm um aspecto UV praticamente idêntico ao do artepillin C. Os compostos isolados podem ser observados na Figura 10 e na Tabela 4:

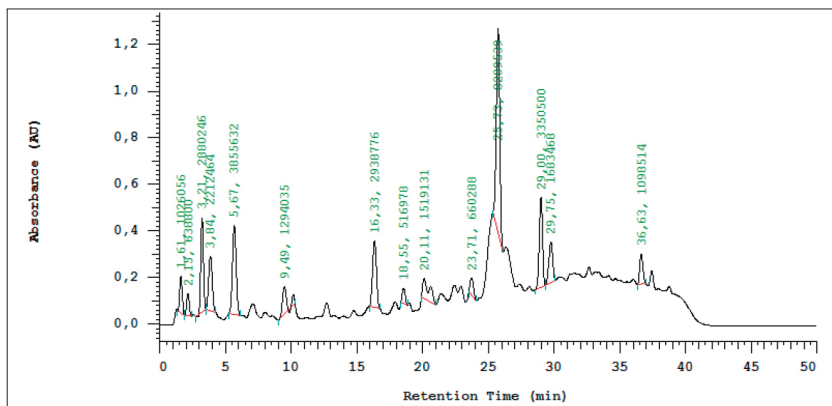


Tabela 4 – Quantificação dos marcadores identificados na própolis bruta (mg do composto/grama de própolis).

Composto	mg/g	%
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	0,415	0,04
Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenoico	0,943	0,09
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	13,60	1,36
Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol	0,453	0,04
Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	0,243	0,02
Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropionil-oxi)- cinâmico	0,438	0,04
Ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico	0,114	0,01
Ácido 3,4-diprenil-4-hidroxicinâmico	0,533	0,05
Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenoico	0,411	0,04
Ácido E/Z comúico	0,360	0,04
15 Metil éster do ácido agático	1,046	0,11
Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico	1,835	0,18
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	3,703	0,37
Ácido cafeoilquínico 1	1,310	0,13
Ácido cafeoilquínico 2	0,810	0,08
Ácido cafeoilquínico 3	3,053	0,30
Ácido cafeoilquínico 4	5,797	0,58
Ácido cafeoilquínico 5	0,996	0,10
Ácido p-cumárico	3,121	0,31
Canferide	2,753	0,27
Total	41,94	4,19

Fonte: Elaborada por Cristina Marcucci (Uniban).

Na Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE), quantificação e identificação dos marcadores da própolis liofilizada em mg do composto/por grama do pó, não foi observada a presença do artepillin C, mas apenas um de seus derivados foi identificado (Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol).

Os compostos da própolis liofilizada encontram-se discriminados na Figura 11 e na Tabela 5.

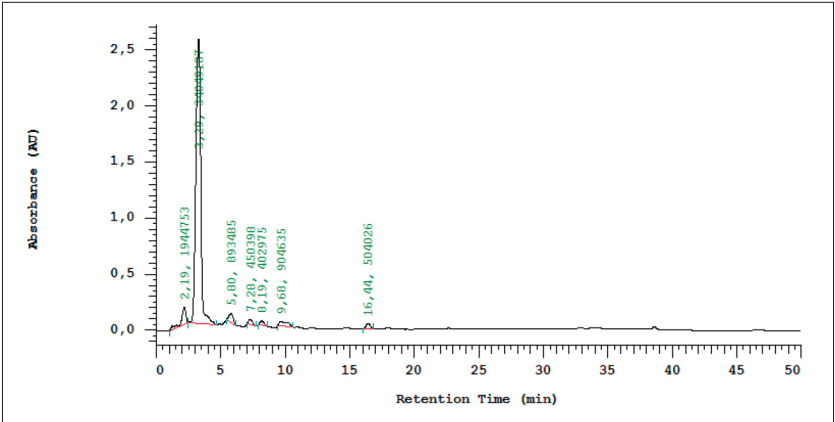


Figura 11 – Cromatograma: (CLAE) de própolis liofilizada
Fonte: (DORNELAS et al., 2012b).

Tabela 5 – Quantificação dos marcadores identificados no liofilizado (mg do composto/grama do pó).

Composto		mg/g	%
1.	Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol	0,385	0,04
2.	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	0,453	0,04
3.	Ácido cafeico	2,450	0,24
4.	Ácido cafeoilquínico 1	1,128	0,11
5.	Ácido p-cumárico	35,99	3,60
Total		40,41	4,04

Fonte: (DORNELAS et al., 2012 b).

As estruturas químicas isoladas podem ser observadas na Figura 12.

Atividade antioxidante da própolis

A própolis liofilizada (*WSDP*) e o extrato etanólico da própolis *in natura*, submetidos a ensaio antioxidante, usando o método do sequestro de radical DPPH (1,1-difenil-2 picril-hidrazil), na concentração de 1000ppm, obtiveram valores próximos ao da atividade antioxidante dos controles vitamina C e Trolox (Tabela 6 e Figura 13).

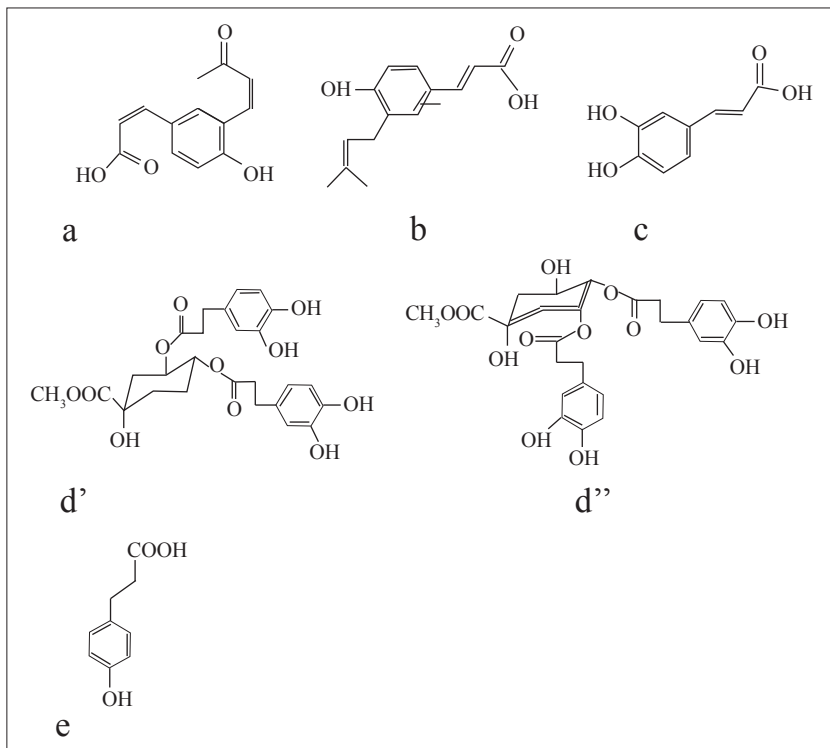


Figura 12 – Estruturas dos compostos isolados: a – Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fênilacrílico] ou propol; b – Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; c – Ácido cafeico; d – Ácido cafeoilquínico - d' - 4' Ácido metil-4,5-di- o -cafeoilquínico ou d'' - Ácido metil-3,4 - di - o - cafeoilquínico ou ácido 3,4 - di -o- cafeoilquínico e- Ácido p-cumárico ou ácido 4- hidroxicinâmico.

Fonte: Marcucci (2006).

Tabela 6 – Atividade antioxidante da própolis verde bruta e liofilizada comparada à atividade antioxidante da vitamina C e Trolox nas concentrações de 1000, 250 e 62,5ppm.

Tratamento	Concentração (ppm)						
	1000		250		62.5		IC ₅₀ (ppm)
	A	%	Atividade	%	A	%	
Controle	0.3440	00.00	0.3440	00.00	0.3440	00.00	00.00
Trolox (T)	0.0104	96.96	0.0197	94.26	0.0206	94.00	0.001
Vitamin C	0.0095	97.25	0.0187	94.59	0.0210	93.92	0.007
EE prop	0.0200	94.19	0.0280	91.86	0.0400	88.37	0.04
Liof-1	0.0170	95.06	0.0200	94.19	0.1180	65.70	28.62

A - Atividade, EE prop – Extrato etanólico de própolis bruta

Liof -1 – Própolis liofilizada (WSDP)

Fonte: Elaborada pelos autores.

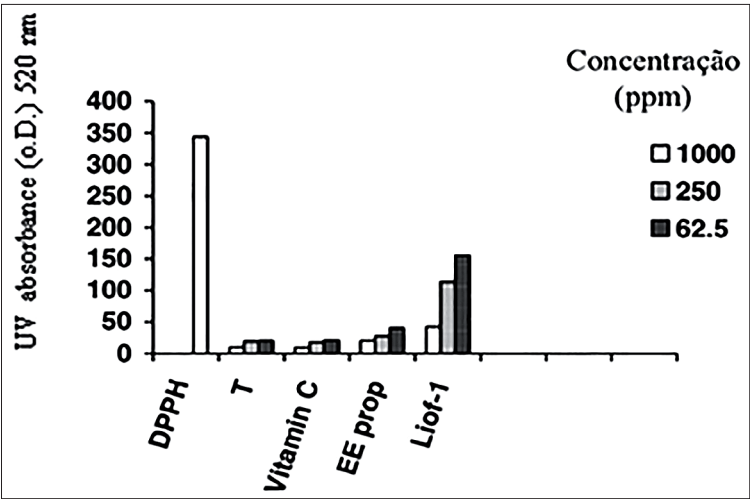


Figura 13 – Atividade antioxidante da (WSDP) e extrato etanólico da própolis *in natura*, comparadas com o controle positivo Vitamina C e Trolox, nas concentrações de 1000, 250 e 62,5ppm.

Fonte: Dornelas et al. (2012b).

Variação temporal da massa corporal

Para a avaliação da ΔMC , consideradas da 1ª à 30ª semanas.

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, I, IV, V, VI, VII, IX foram feitas pela análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois.

Constatou-se que a ΔMC (variação da massa corporal) mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos em todos os tempos estudados (Figura 14).

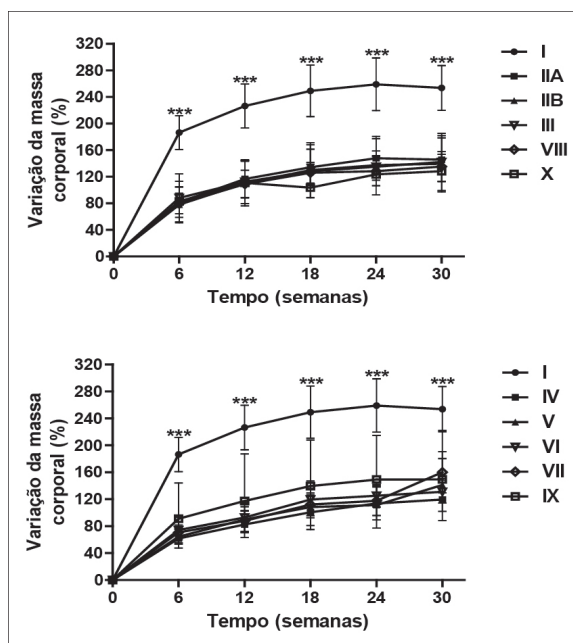


Figura 14 – Variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, verificada nos grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, IV, V, VI, VII e IX, durante as primeiras 30 semanas do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Constatou-se que a ΔMC mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos em todos os tempos estudados.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Para a avaliação da ΔMC , entre a 1ª e a 41ª semanas.

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos I, IIA, IIB, III, VIII, XI, XIII, X, XI, XII e XIII foram feitas pela análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois.

Constatou-se que a ΔMC (variação da massa corporal) mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos em todos os tempos estudados (Figura 15).

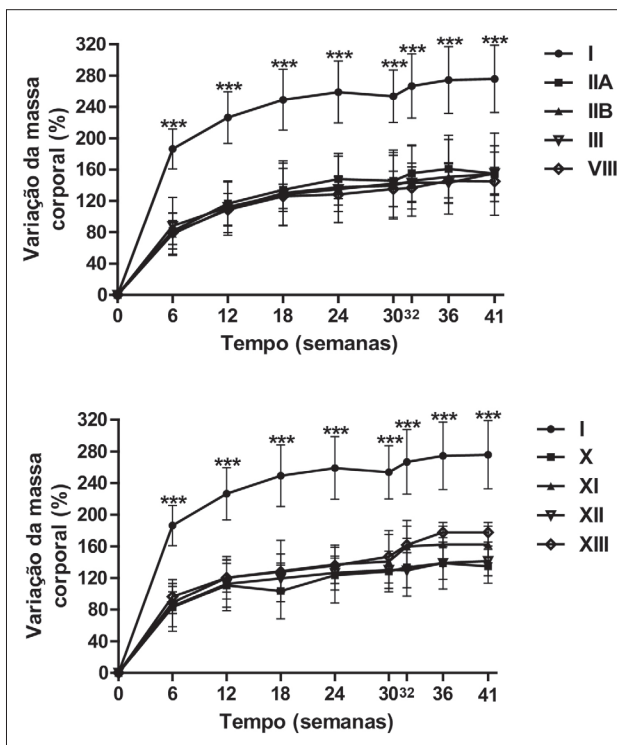


Figura 15 – Variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, verificada nos grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, XI, XII e XIII, durante as 41 semanas do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Constatou-se que a ΔMC mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos em todos os tempos estudados.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Para a avaliação da ΔMC , consideradas as semanas 32^a a 40^a.

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos K, L, M e N foram feitas pela análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois.

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (Figura 16).

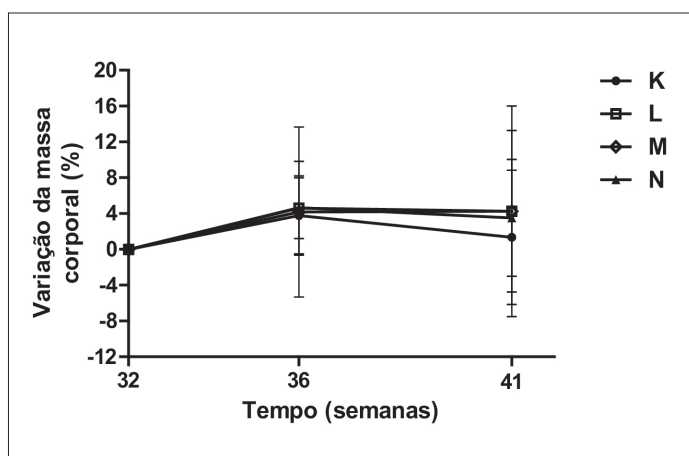


Figura 16 – Variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, verificada nos grupos K, L, M e N, durante o período compreendido entre a 32^a e a 41^a semana do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Avaliação do peso corporal e peso do fígado, baço e rins

Na avaliação dos pesos do corpo, fígado e baço, no momento do óbito ou eutanásia, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA: $F = 0,8865$; $P = 0,5560$), peso do fígado (ANOVA: $F = 0,9018$; $P = 0,5416$) e peso do baço (ANOVA: $F = 1,0220$; $P = 0,4330$). A análise de variância evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao peso dos

rins (ANOVA: $F = 3,6100$; $P = 0,0002$). Aplicou-se então o teste de Tukey, sendo verificado que o peso dos rins relativo ao grupo XIII foi significativamente maior que o referente aos grupos IIB ($P<0,01$), X ($p<0,01$), K ($p<0,05$), M ($P<0,05$) e N ($P<0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Média e desvio padrão do peso corporal e peso do fígado, baço e rins mensurados nos diversos grupos. Comparações entre grupos foram realizadas pela análise de variância associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey.

Grupo e Tratamento	Número de animais	Peso do corpo, fígado, baço e rins em gramas, no momento da eutanásia ou óbito			
		Corpo	Fígado	Baço	Rins
I – BBN + Própolis intragástrica	10	237,3 ± 23,26	7,51 ± 0,84	0,84 ± 0,19	1,95 ± 0,41
IIA – BBN + Própolis subcutânea	07	238,14 ± 17,93	7,79 ± 1,10	0,74 ± 0,17	1,77 ± 0,27
IIB – BBN + H ₂ O subcutânea	06	234,83 ± 35,01	6,66 ± 1,25	0,80 ± 0,42	1,43 ± 0,15 **
III – BBN + Própolis intragástrica	19	240,26 ± 21,05	6,93 ± 1,03	0,87 ± 0,55	1,81 ± 0,43
X – BBN + Lisina intragástrica	06	240,00 ± 18,51	6,07 ± 2,59	0,60 ± 0,26	1,48 ± 0,35**
K – BBN	13	240,00 ± 24,72	6,70 ± 1,88	0,80 ± 0,46	1,69 ± 0,43*
L – BBN + Lisina intragástrica	13	222,23 ± 30,04	7,22 ± 1,27	0,62 ± 0,18	1,64 ± 0,29*
M – BBN + Celecoxibe intragástrico	12	226,50 ± 27,68	7,34 ± 1,26	0,60 ± 0,24	1,67 ± 0,32*
N – BBN + Própolis intragástrica	12	240,31 ± 25,35	7,35 ± 1,25	0,73 ± 0,27	1,43 ± 0,53****
XI – Própolis	06	238,00 ± 22,84	7,21 ± 0,63	0,83 ± 0,46	1,97 ± 0,19
XII – Lisina	05	250,20 ± 8,07	7,38 ± 0,51	0,82 ± 0,18	1,64 ± 0,27
XIII – Água	06	242,00 ± 15,11	7,12 ± 0,70	0,55 ± 0,10	2,34 ± 0,28

***P< 0,001; **P<0,01; *P<0,05 em relação ao grupo XIII.
Fonte: Elaborada pelos autores.

Evolução clínica, mortalidade, sobrevida e causa mortis dos animais

Evolução clínica:

Os sinais clínicos da neoplasia vesical foram: hematúria, massa palpável suprapúbica, massa visível em abdome e dois casos de ascite.

A hematúria foi o sinal clínico mais observado. O primeiro caso de hematúria macroscópica ocorreu na 26ª semana (rato Grupo III). Ao sinal de hematúria, os animais foram isolados em gaiolas individuais, pelo risco de canibalismo. O canibalismo ocorreu em cinco casos e a bexiga tumoral foi o primeiro órgão a ser ingerido pelos animais. Ao final da 41ª semana, 85% dos animais apresentavam hematúria macroscópica.

A hemoptise ocorreu em cinco animais dos grupos que foram submetidos à gavagem com própolis durante o procedimento, sem outras complicações. Cinco ratos sofreram mordeduras com ferimentos cutâneos. Curativos com iodopovidona a 10% promoveram cicatrização rápida.

Os 125 animais exibiram uma boa evolução clínica, até a 21ª semana. A partir da 22ª semana, sete de 58 animais (grupos que receberam apenas carcinógeno) e três de 43 animais (que receberam carcinógeno e própolis + lisina intragástrico) apresentaram sinais de comprometimento respiratório, tais como espirros, tosse, dispneia e diminuição da ingestão de líquidos e alimentos. Estes animais foram isolados dos demais e evoluíram para o óbito.

O número de óbitos ocorrido entre a 1ª e a 31ª semana foi de dez animais (12,50%). Estes animais foram excluídos da avaliação final (Tabela 10).

Entre a 32ª e a 41ª semana, ocorreram 27 óbitos (23,47%). Em 41 semanas, o total foi de 37 óbitos (29,06%) (Tabela 8).

Mortalidade: Encontram-se nas Tabelas 8 e 9 a mortalidade ocorrida nas 41 semanas.

Tabela 8 – Mortalidade entre a 1ª. e a 31ª. semana.

MORTALIDADE ENTRE A 1ª E 31ª SEMANA								
Grupo	Substância	N	Nº	%	SEMANAS			
					23s	29s	30s	31s
I	BBN/P/L P um mês antes	10	0	00,00				
		07						
IIA	BBN/P/L Subcutâneo		0	00,00				
IIB	BBN/H ₂ O Subcutâneo	06	0	00,00				
III	BBN/P/L intragástrica	10	1	20,00			01	
VIII	BBN/P/L intragástrica	10	2	10,00	02			
subtotal		43	03					
IV	BBN	10	1	10,00				01
V	BBN	10	1	10,00				01
VI	BBN	10	1	10,00		01		
VII	BBN	10	2	20,00		02		
IX	BBN	18	2	11,11	01		01	
Subtotal		58	7					
X	BBN/L intragástrica	06	0	00,00				
XI	P/L	06	0	00,00				
XII	L	06	0	00,00				
XIII	H ₂ O	06	0	00,00				
Total 1ª e 32ª s		125	10	12,50%				

N – ene; No – número de óbitos; H₂O – Água; s – Semana; BBN/P/L – BBN e própolis extraída em lisina; BBN/L – BBN e lisina; P – Própolis; L – lisina.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 9 – Mortalidade entre a 32ª e a 41ª semana.

MORTALIDADE ENTRE A 32ª E 41ª SEMANA												
Grupo	Substâncias	N	Nº	%	SEMANAS							
					32ª s	35ª s	36ª s	37ª s	38ª s	39ª s	40ª s	41ª s
I	BBN/P/L P um mês antes	10	0	00,00								
IIA	BBN/P/L Subcutâneo	07	1	14,28						01		
IIB	BBN/H ₂ O Subcutâneo	06	0	00,00								
III (III+VIII)	BBN/P/L Intragastrica	17	6	30,00			01			01	03	01
		40	7	17,50								
K	BBN	13	4	30,76		01	01					02
L	BBN/LL	13	6	46,15		01		01	02	02		
M	BBN/Cel	12	5	41,66		01			01		02	01
N	BBN/PP	13	3	23,07		01		01			01	
		51	18	35,29								
X	BBN/L Intragastrica	06	1	16,66							01	
		06	1	16,66								
XI	P/L	06	0	00,00								
XII	L	06	1	16,66	01							
XIII	H ₂ O	06	0	00,00								
		18	1	05,50								
Total	31ª e 41ª s	115	27	23,47								
Geral	1ª e 41ª s	125	37	29,06								

N – eno; No – número de óbitos; H₂O – Água; s – Semana; BBN/P/L – BBN e própolis extraída em lisina; BBN/L – BBN e lisina;

P – Própolis; L – Lisina; LL – Dupla dose de lisina; PP – Dupla dose de própolis extraída em lisina; Cel – Celecoxibe;

Fonte: Elaborada pelos autores.

Análise de sobrevivência

Baseadas nas tabelas anteriores 11 e 12, a análise de sobrevivência foi realizada segundo o método de Kaplan-Meier, dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo. A comparação entre os grupos através do teste de log-rank não evidenciou diferença estatística entre os grupos que ingeriram apenas carcinógeno (IV+V+VI+VII+IX) e os grupos que ingeriram carcinógeno e outra substância própolis/lisina e água em diferentes vias I, IIA, IIB e III+VIII nas primeiras 31 semanas (Figura 17)

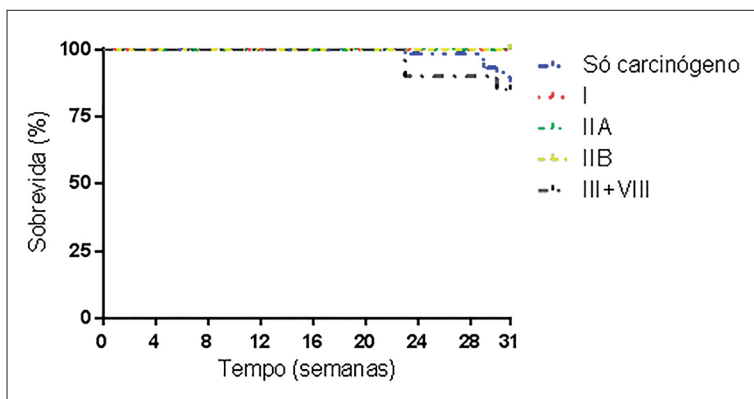


Figura 17 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos que receberam só carcinógeno (IV+V+VI+VII+IX), I, IIA, IIB e III+VIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as primeiras 31 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,5100$). Sobrevida na 31ª semana do experimento: Controle = 87,93%; I = 100,00%; IIA = 100,00%; IIB = 100,00%; III+VIII = 85,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na comparação dos grupos K, L, M e N, mantendo o método de Kaplan-Meier e considerando o período entre a 31ª e 41ª semanas do experimento, e dados expressos, como percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou a 31ª semana do estudo, o teste de log-rank não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 18).

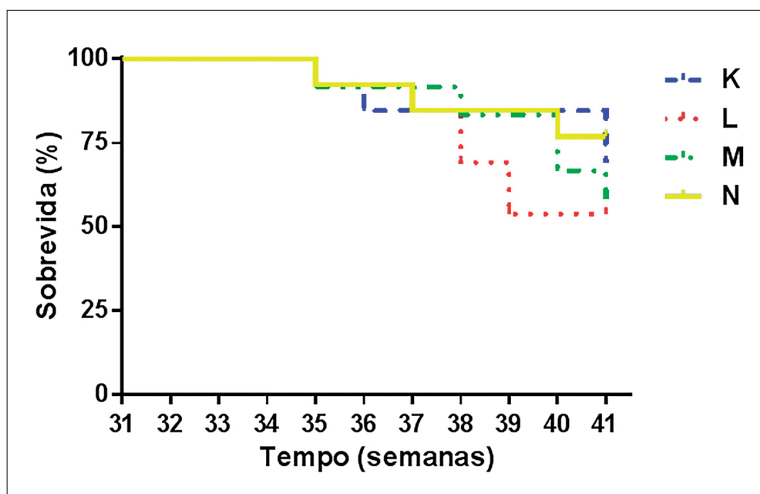


Figura 18 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, L, M, N construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,5964$). Sobrevivência na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; L = 53,85%; M = 58,33%; N = 76,92%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Comparando os grupos K, I, III, XI, XII e XIII entre o período da 31ª e 41ª semana, dados expressos, como percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou a 31ª semana do estudo, o teste de log-rank não evidenciou diferenças estatisticamente significantes (Figura 19).

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos X, I, III, XI, XII e XIII, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento, dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou a 31ª semana do estudo, o teste de log-rank não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 20).

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos X, I, III+VIII, XI, XII e XIII, considerando 41 semanas do experimento, dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo, o teste de log-rank não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 21).

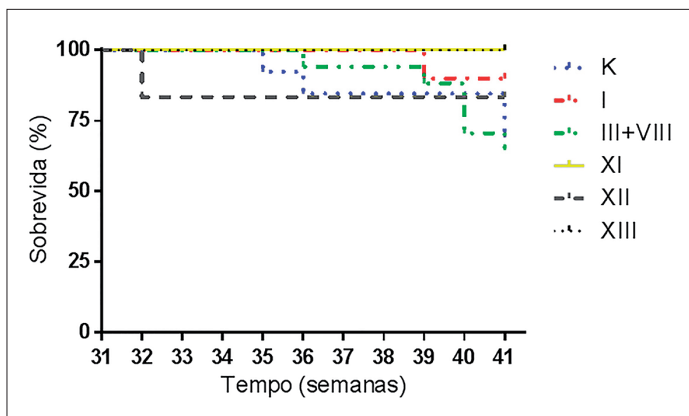


Figura 19 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos K, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,2952$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; III+VIII = 64,71%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

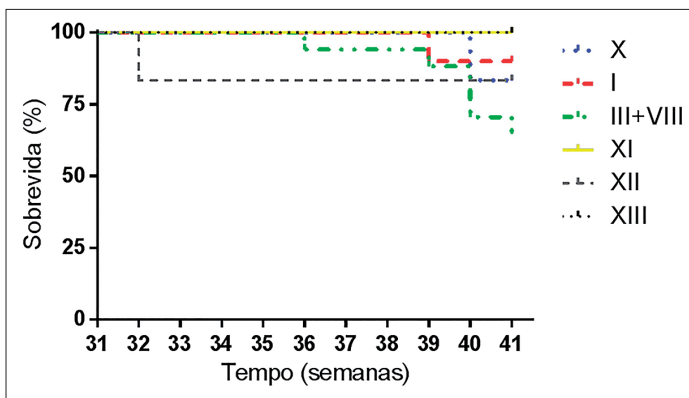


Figura 20 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos X, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª. e a 41ª. semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,3070$). Sobrevida na 41ª. semana do experimento: X = 83,33%; I = 90,00%; III+VIII = 64,71%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

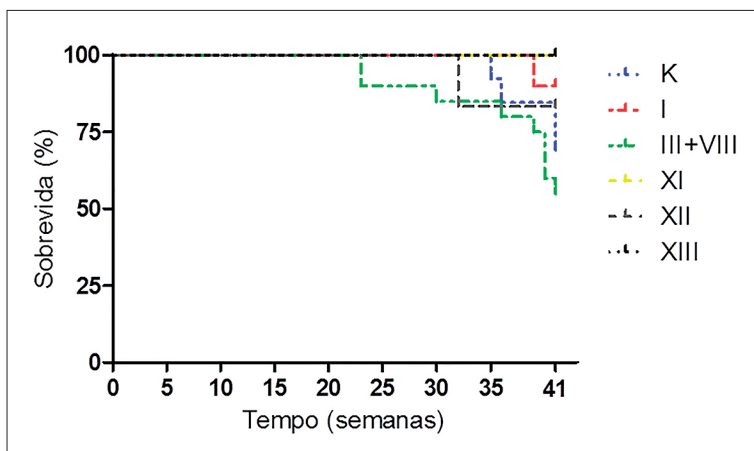


Figura 21 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0869$). Sobrevivência na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, I, IIA, IIB e III+VIII, considerando as 41 semanas do experimento, dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo, o teste de log-rank não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 22).

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, I, IIA, IIB e III+VIII, considerando as 41 semanas do experimento, dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo, o teste de log-rank evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0463$) entre elas. Todavia, comparando-se as curvas duas a duas, após efetuar o ajuste para múltiplas comparações usando o método de Bonferroni (limite de significância = $0,05/10 = 0,005$), não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 23).

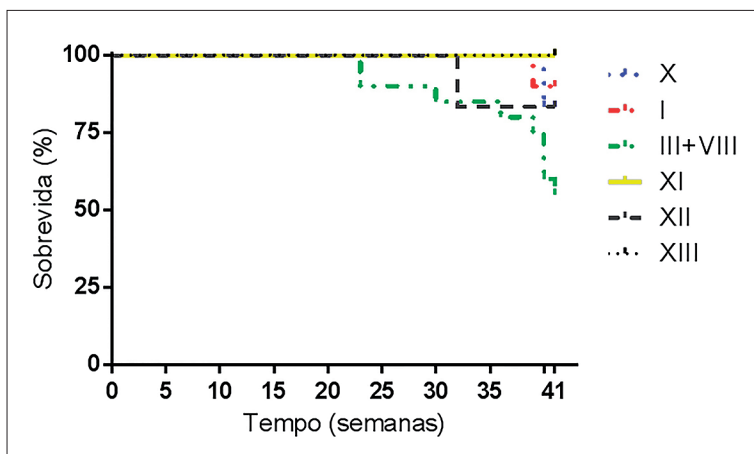


Figura 22 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos X, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0673$). Sobrevivência na 41ª semana do experimento: X = 83,33%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

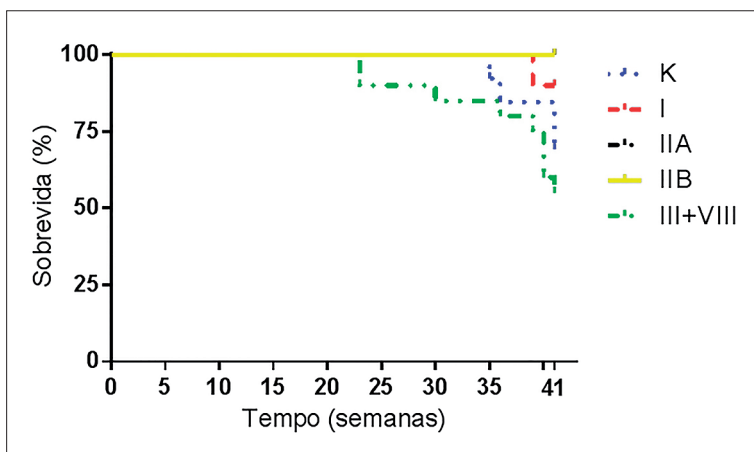


Figura 23 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, I, IIA, IIB e III+VIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0463$) entre elas. Todavia, comparando-se as curvas duas a duas, após efetuar o ajuste para múltiplas com-

rações usando o método de Bonferroni (limite de significância = $0,05/10 = 0,005$), não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes. Sobrevida na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; IIA = 100,00%; IIB = 100,00%; III+VIII = 55,00%.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Causa mortis

A *causa mortis* entre a 1ª e a 31ª semana encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 – *Causa mortis* entre a 1ª e a 31ª semana.

<i>Causa mortis</i>	Nº e % de animais
Broncopneumonia + abscesso pulmonar	02 (20,00)
Broncopneumonia + infecção urinária	02 (20,00)
Broncopneumonia	04 (40,00)
Infecção urinária	01 (10,00)
Infecção urinária, hidronefrose, litíase urinária	01 (10,00)
Total	10 (100,00)

Fonte: Elaborada pelos autores.

A *causa mortis* mais frequente entre a 32ª e a 41ª semana foi a broncopneumonia. Os números podem ser observados na Tabela 11 e nas Figuras 24 e 25.

Tabela 11 – *Causa mortis* entre a 32ª e a 41ª semana.

<i>Causa mortis</i>	Nº e % de animais
Broncopneumonia + abscesso pulmonar	01 (03,70)
Broncopneumonia + infecção urinária	02 (07,40)
Broncopneumonia	12 (44,44)
Infecção urinária	06 (22,22)
Infecção urinária, hidronefrose, litíase urinária	06 (22,22)
Total	27 (100,00)

Fonte: Elaborada pelos autores.

Em um dos ratos que apresentava ascite, ao exame no citômetro, observou-se escassez de células - fase G1. Na autópsia foi identificada fístula pielo abdominal, por ruptura de cápsula renal (pielonefrite e hidronefrose por obstrução tumoral) (Figura 25).

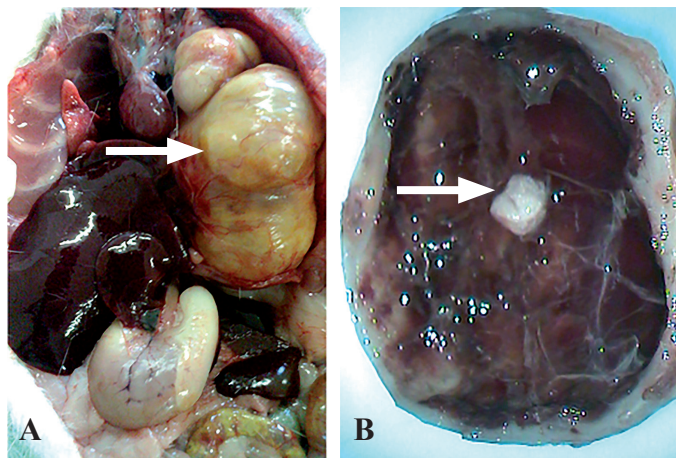


Figura 24 – **A** - Volumoso abscesso em cavidade torácica ocupando todo o hemitórax esquerdo (seta). Há fibrina em mediastino e pericárdio (Grupo L - Rato 12); **B** - Hidronefrose de rim esquerdo substituído por uma cavidade que mede 2,0 x 2,0cm. O parênquima renal ficou reduzido apenas a uma pseudocápsula com escasso tecido fibroso e septos fibrinoides e um cálculo em seu interior – seta (Grupo X - Rato 3).
Fonte: Elaborada pelos autores.

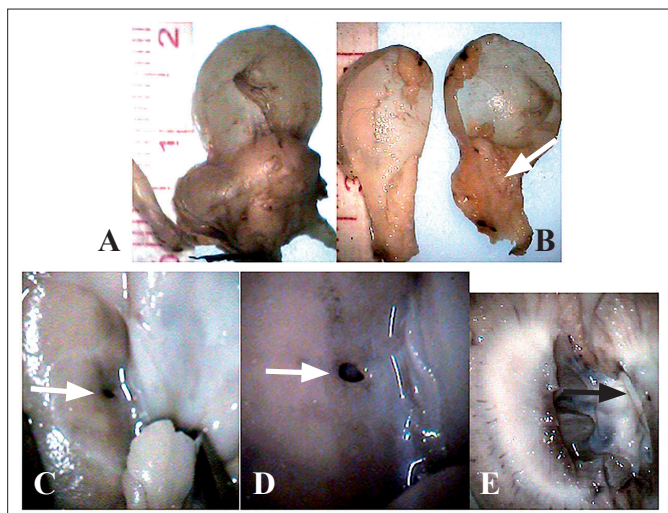


Figura 25 – **A** - Bexiga apresenta tumoração em nível de óstio ureteral com ureter dilatado; **B** - Bexiga aberta, detalhes da tumoração; **C, D, E** - Rim esquerdo - fístula piélica (setas), dilatação piélica - Grupo L - Rato 5.
Fonte: Elaborada pelos autores.

Ultrassonografia dos tumores

As imagens ultrassonográficas identificaram tumorações e determinaram o início do tratamento (grupos K, L, M e N) e evolução das lesões entre a 31^a e a 40^a semana (Figura 26).

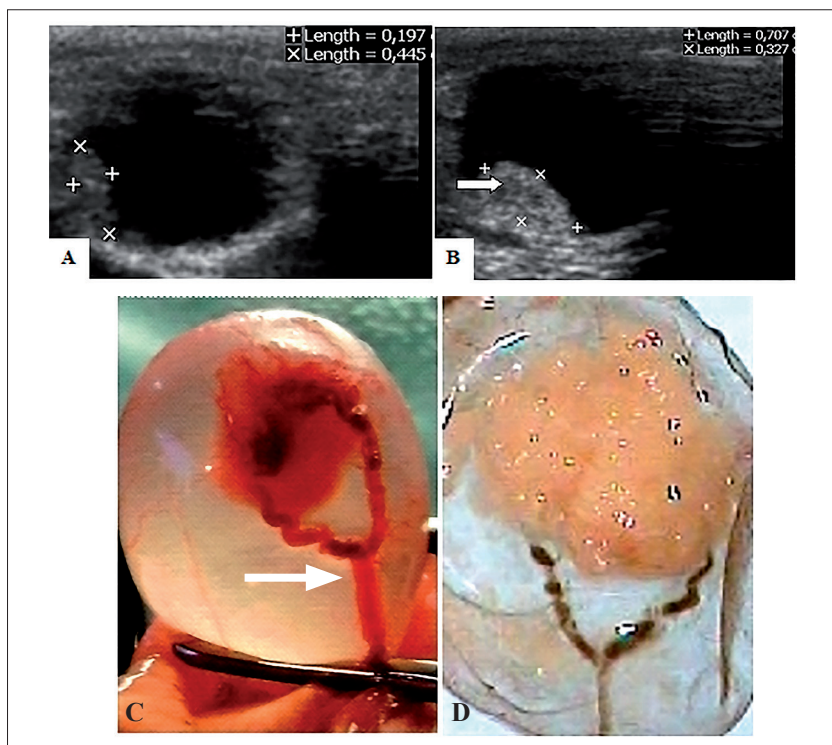


Figura 26 – **A e B** - Ultrassonografia na 31^a. e 40^a. semana evidencia imagem tumoral em parede posterior, fazendo projeção para o interior da bexiga (detalhe do vaso em seta branca em B); **C** - Mesma bexiga *in vivo* por transluminação observa-se tumoração intravesical com vasos calibrosos e tortuosos em sua direção (vaso da imagem ultrassonográfica); **D** - Bexiga aberta, fixada em formol a 10%, detalhe da tumoração delicada em forma de couve-flor em parede vesical - Grupo L - Rato 9.

Fonte: Dornelas et al. (2012a).

Algumas complicações do carcinoma de bexiga de grande volume foram flagradas no exame de ultrassonografia (Figura 27).

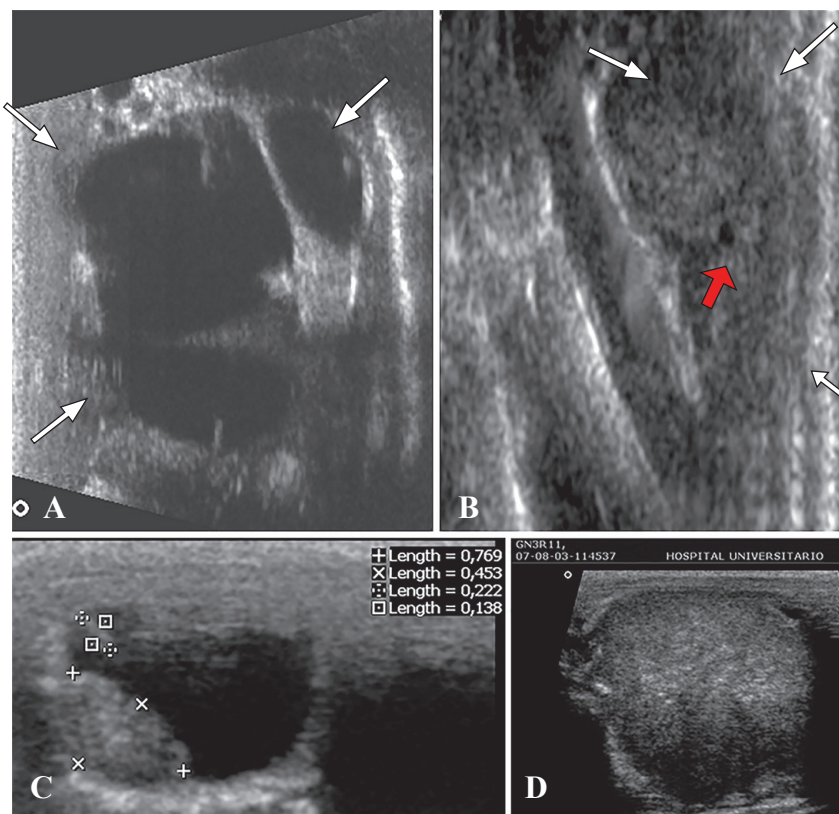


Figura 27 – Ultrassonografia (US) 40^a. semana: **A** - Rim direito, lojas de cálices e pelvis dilatados (setas); **B** - US rim esquerdo (setas brancas) com discreta hidronefrose (seta vermelha); **C** - US de bexiga na 31^a. semana; **D** - US tumoração intravesical sólida de grande volume (3,5 x 2,5x 3,0cm); **E** - Peça fixada mostra rim direito (3,0cm) e esquerdo (2,0cm) aumentados, ureteres dilatados, grande tumoração vesical infiltrante, envolvendo mesentério medindo 5, 5 x 3,0 x 3,0cm (Grupo N - Rato 11).

Fonte: Elaborada pelos autores.



As imagens foram adquiridas conforme discriminado em materiais e métodos. Foram anotados o maior e o menor diâmetro da maior lesão de cada bexiga, por grupo, na 31ª e 40ª semana. Foram ainda identificadas bexigas sem imagens, bexigas com múltiplas imagens, e sua correlação com a macroscopia, conforme sendo lesão única, focal ou difusa, bem como correlação com a microscopia (hiperplasia, papiloma, lesão de baixo potencial maligno e maligna), por bexiga e por grupo.

A Tabela 12 sintetiza o número de bexigas com várias imagens tumorais por grupo na 31ª e 40ª semana. Sete de 21 animais que apresentavam várias imagens tumorais (+ de duas imagens), na 31ª semana, evoluíram para o óbito antes da 40ª semana. Três bexigas que apresentavam a visibilidade de múltiplas lesões na 31ª semana não foram confirmadas na 40ª semana. O grupo X se revela com 100% de múltiplas imagens tumorais na 40ª semana.

Tabela 12 – Número de bexigas com várias imagens tumorais na 31ª e 40ª semanas, por grupo.

Grupos	31 semanas			40 semanas		
	N	Nº de bexigas	%	N	Nº de bexigas	%
I	10	1		10	8	
IIA	07	3* , #		06	4	
IIB	06	1#		06	4	
III(III + VIII)	10	3*,*, #		08	5	
	09	4*		08	4	
Subtotal	42	12	28,57	38	25	65,78
K	13	1		11	5	
L	13	1*		08	5	
M	12	4*,*		10	3	
N	13	1		12	6	
Subtotal	51	07	13,72	41	19	46,34
X	6	2	33,33	5	5	100,00
Total	99	21	21,21	84	49	58,33

N ene - Nº número

* Sete de 21 animais que apresentavam várias imagens tumorais (+ de 2 imagens), na 31ª semana, evoluíram para o óbito antes da 40ª semana.

Três bexigas como visibilidade de várias imagens tumorais na 31ª semana não foram confirmadas na 40ª semana.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na Tabela 13 está discriminado, por grupo, o número de bexigas sem imagem (SI) tumoral na 31ª e 40ª semanas. Nove bexigas SI tumoral na 31ª semana apresentaram várias imagens tumorais na 40ª semana. Quatro das bexigas que não apresentaram imagem tumoral na 31ª semana persistiram sem imagem tumoral na 41ª semana e as quatro imagens não apresentaram câncer na avaliação histopatológica.

Tabela 13 – Número de bexigas sem imagem tumoral (SI) na 31ª semana e 40ª semana, por grupo.

Grupos	31 semanas			40 semanas		
	N	Nº de bexigas SI	%	N	Nº de bexigas SI	%
I	10	4 [#]		10	1*	
IIA	07	1 [#]		06	0	
IIB	06	3 ^{#, #}		06	0	
III (III +VIII)	10	0		08	0	
	09	0		08	0	
Subtotal	42	8	19,04	38	1	0,26
K	13	4 [#]		11	0	
L	13	4		08	3*	
M	12	3 ^{#, #}		10	0	
N	13	2 [#]		12	0	
Subtotal	51	13	25,49	41	3	7,31
X	06	1 [#]	16,66	5	0	0,00
Total	99	22	22,00	84	4	4,76

N ene - Nº. número

9 bexigas SI tumorais na 31ª. semana apresentavam várias imagens tumorais na 40ª. semana.

Quatro bexigas persistiram SI tumorais na 40ª. semana e as quatro apresentavam hiperplasias e papilomas na histopatologia (Figura 28).

Fonte: Elaborada pelos autores.

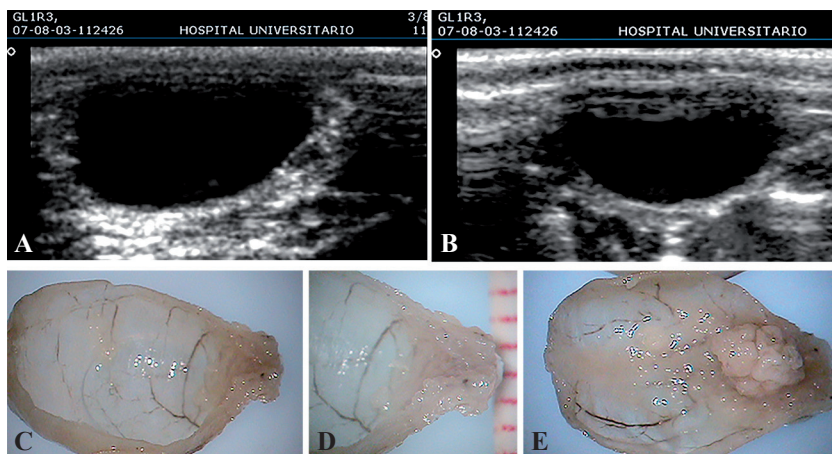


Figura 28 – **A e B**: Ultrassonografia: Bexiga sem imagem tumoral na 40ª semana; **C, D, E** - Exame macroscópico: lesão localizada em colo vesical na parede posterior, polipoide, com aspecto de couve-flor, medindo 0,4 x 0,3cm. Outras diminutas lesões podem ser observadas. Aumento de 10 x, 20 x e 40 x em microscópio estereoscópico. Grupo L - Rato 3. Fonte: Elaborada pelos autores.

A seguir, na Tabela 14, observa-se a correlação entre o número de imagens tumorais na 40ª semana e os achados na microscopia por

Tabela 14 – Correlação do número de imagens tumorais com a microscopia em ultrassonografia realizada na 40ª semana.

Grupos	N	Nº de bexigas com uma e/ou duas imagens tumorais		Nº de bexigas com várias imagens (+ de 2)	
		Histopatologia		Histopatologia	
		Hiperplasias e Benignas Nº e %	Maligna Nº e %	Hiperplasias e Benignas Nº e %	Maligna Nº e %
I	10	1	0	6	2
IIA	06	2	0	3	1
IIB	06	1	1	4	0
III (III+VIII)	08	2	1	3	2
	08	2	2	1	3
Subtotal	38	8 (21,0)	4 (10,5)	17 (44,7)*	8 (21,0)
K	11	4	2	0	5
L	08	0	2	0	3
M	10	1	2	0	6
N	12	2	3	2	5
	41	7 (17,0)	9 (21,9)	2 (4,8)	19 (46,3)*
X	06	0	0	0	5 (100,0)
Total	84	15 (17,8)	13 (15,4)	19 (22,6)	27 (32,1)

Fonte: Elaborada pelos autores.

grupo. A multiplicidade de imagens está relacionada com neoplasia maligna apenas nos grupos K, L, M e N, mas nos grupos I, II, III e (III) acontece exatamente o oposto.

Morreram três animais durante os exames de ultrassonografia. Um na 31ª semana e dois na 41ª semana. Os animais apresentavam broncopneumonia ao exame de necropsia.

Exame macroscópico

Ao final da 41ª semana, 100% dos animais que foram submetidos à carcinogênese apresentavam lesões tumorais multifocais de diversos tamanhos, em parede vesical (observadas através de transluminação) (Figura 29), algumas delas de tamanho volumoso, invadindo a parede, infiltrando-se em tecidos adjacentes, linfonodos locais, outras comprimindo ureter com hidronefrose unilateral ou bilateral (Figura 30).

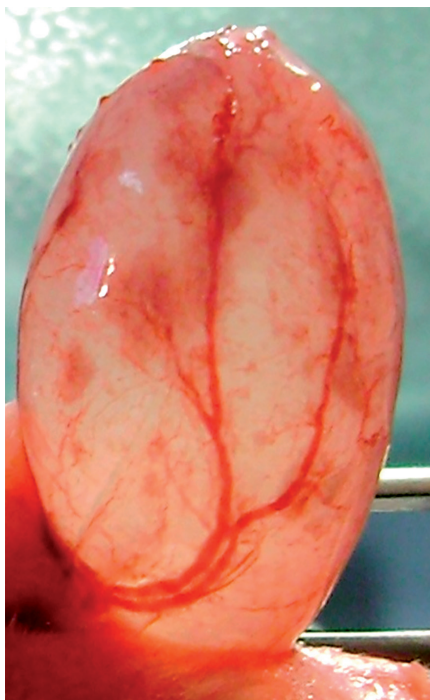


Figura 29 – Bexiga cheia transluminada, apresentando múltiplas sombras de múltiplas lesões tumorais em parede vesical distribuídas difusamente. Vasos calibrosos direcionados para lesões maiores (Grupo L - Rato 10).

Fonte: Elaborada pelos autores.

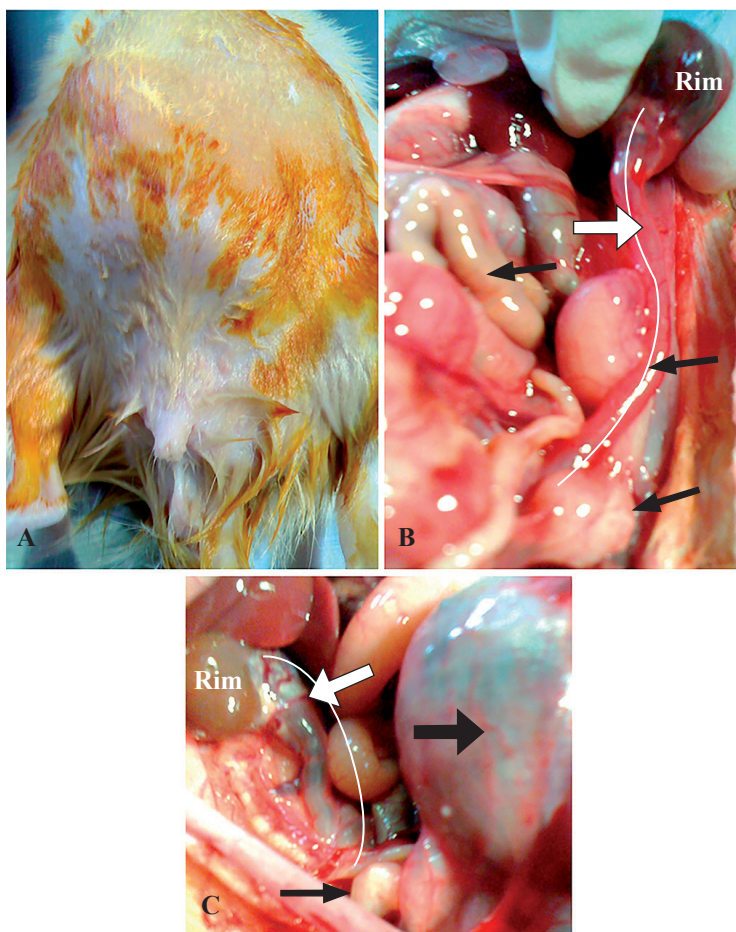


Figura 30 – **A** - Abdome volumoso com massas visíveis; **B e C** - Ureterohidronefrose bilateral, ureteres dilatados (setas e contorno de linhas brancas) e bexiga com tumor e linfonodos (setas pretas) (Grupo III - Rato 11- 35 semanas).
Fonte: Elaborada pelos autores.

Observou-se, na parede vesical, vasos calibrosos, tortuosos e serpentinosos, dirigindo-se para estas tumorações, constituindo uma rede vascular macroscópica (Figura 31).

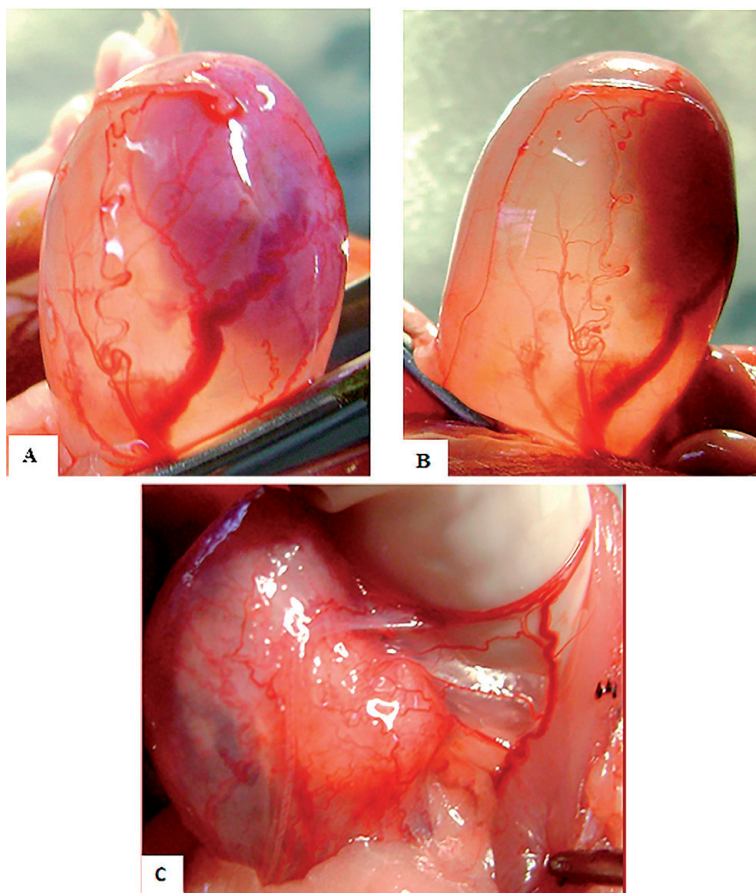


Figura 31 – **A e B** (DORNELAS et al., 2012a) - Bexiga ampliada (mede 1,2cm) transluminada em ratos anestesiados, onde se veem tumorações intravesicais irrigadas por vasos anômalos espiralados, calibrosos, tortuosos; **C** - Rede neovascular proveniente de vasos epigástricos da parede abdominal, nutrindo o tumor que faz protrusão além da parede vesical (Grupo X - Rato 3).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Após fixação, as bexigas abertas examinadas apresentavam lesões papilares, polipoides, delicadas, róseas, com aspecto de couve-flor (Figura 32), umas sésseis, outras pediculadas, focais ou difusas.

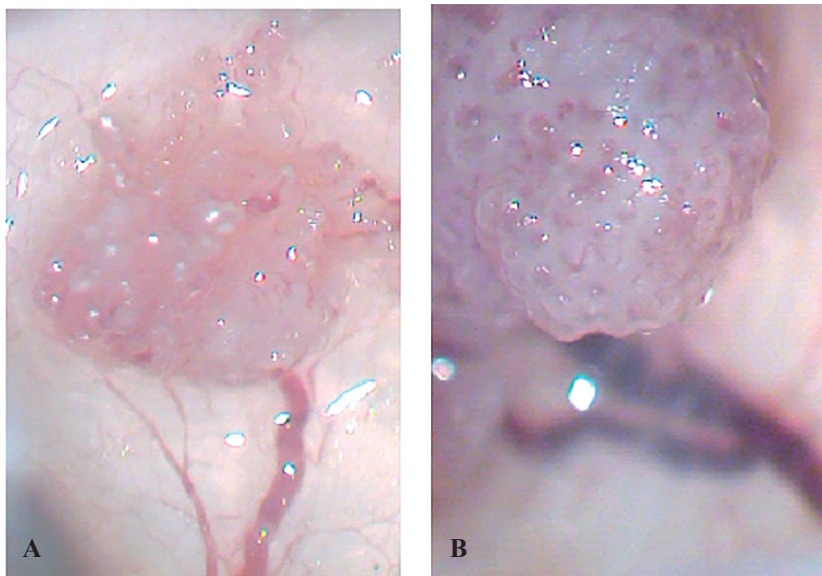


Figura 32 – **A e B** - Bexiga aberta fixada - Lesões papilares delicadas em aspecto de couve-flor intravesical (Grupo I - Rato 1). Foto em microscópio estereoscópico 20 x de aumento. Fonte: Elaborada pelos autores.

Outras tumorações de grande tamanho apresentavam áreas de necrose, hemorragia e urina com odor fétido. Poucas bexigas apresentavam cálculos esbranquiçados em seu interior.

Em um rato foi identificada tumoração intraureteral, ocupando toda extensão do ureter e obstruindo totalmente sua luz dilatada por urterohidronefrose, sem invasão da parede. Tumoração renal foi observada em três ratos. A tumoração papilar localizada em pelve renal apresentou invasão de parênquima renal em dois animais (Figura 33).

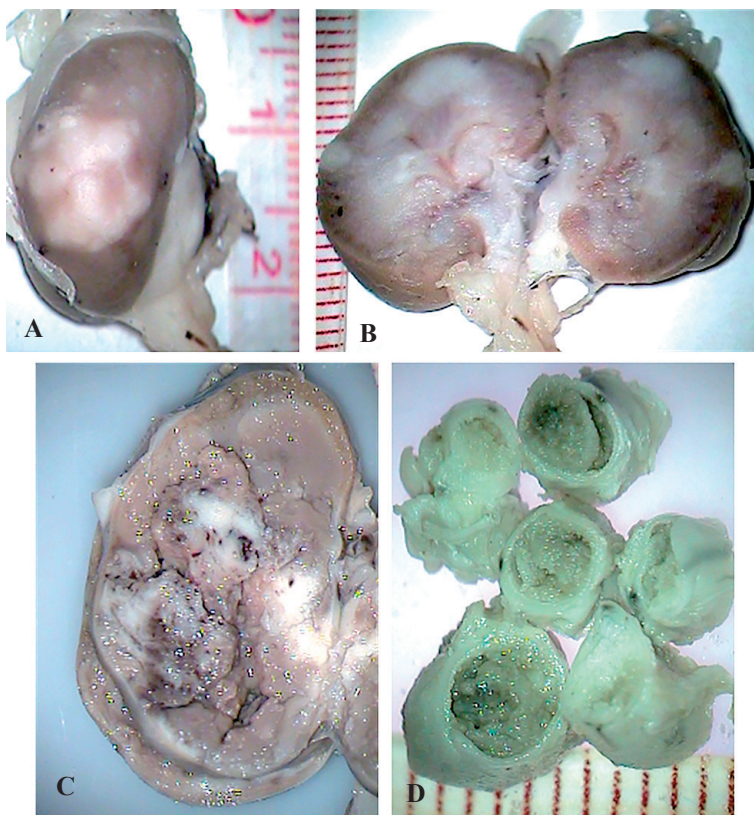


Figura 33 – **A e B** Tumor renal - Nódulos esbranquiçados confluentes em córtex renal e projeção tumoral papilar na pelve e invasão do córtex renal; **C** - Tumor de pelve renal invadindo todo o parênquima renal com áreas de necrose; **D** - Cortes transversais de ureter dilatado (até 4mm de diâmetro) com conteúdo tumoral sem infiltração de parede (Grupo X - Rato 6) (Grupo III - Rato 18).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Avaliação microscópica da carcinogênese

Foram excluídos da avaliação da carcinogênese os dez ratos que morreram antes da 31ª semana, três animais que apresentavam autólise intensa, três por apresentarem carcinoma de células transicionais renais e cinco animais vítimas de canibalismo.

Os grupos XI, XII e XIII, que não ingeriram carcinógenos, apresentaram epitélio vesical com três camadas sem particularidades (Figura 34).

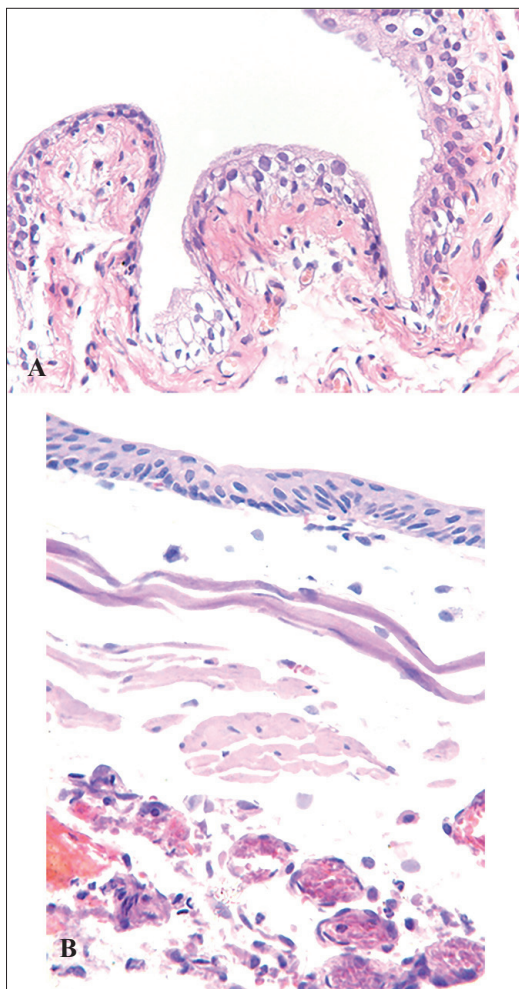


Figura 34 – Epitélio vesical normal. **A** - Bexiga vazia: pregas na mucosa; **B** - Bexiga distendida. Cortes histológicos de parede vesical corados pela HE – 400 x.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Nos demais grupos, observam-se múltiplas lesões intravesicais evolutivas da carcinogênese vesical: lesões pré-neoplásicas: hiperplasias (planas, papilares e nodulares) com atipias focais e metaplasia escamosa ou glandular (Figuras 35 a 36).

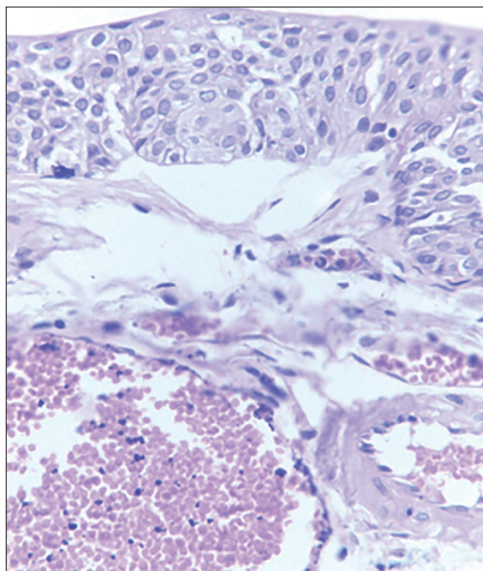


Figura 35 – Hiperplasia plana (mais de três camadas de células no epitélio) - Grupo 1 - Rato 2 - Corte histopatológico de lesão vesical corado pelo hematoxilina eosina (HE) - 400 x.

Fonte: Elaborada pelos autores.

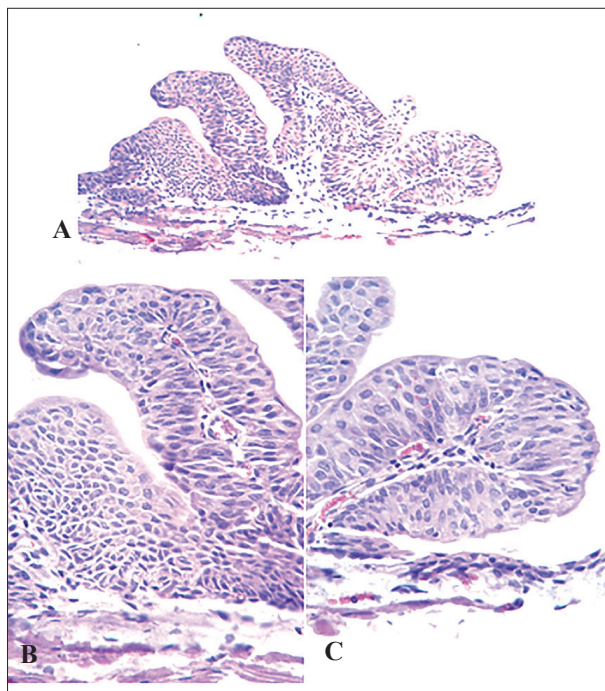


Figura 36 – **A, B e C** - Hiperplasia papilar: projeções papilares com eixo fibrovascular central (Grupo N - Rato 40 x e 400 x). Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE. Fonte: Elaborada pelos autores.

Também foram identificadas lesões neoplásicas benignas: papilomas (exofíticos e endofíticos) em epitélio vesical (Figura 37) e epitélio de pelve renal com ou sem metaplasia escamosa ou glandular.

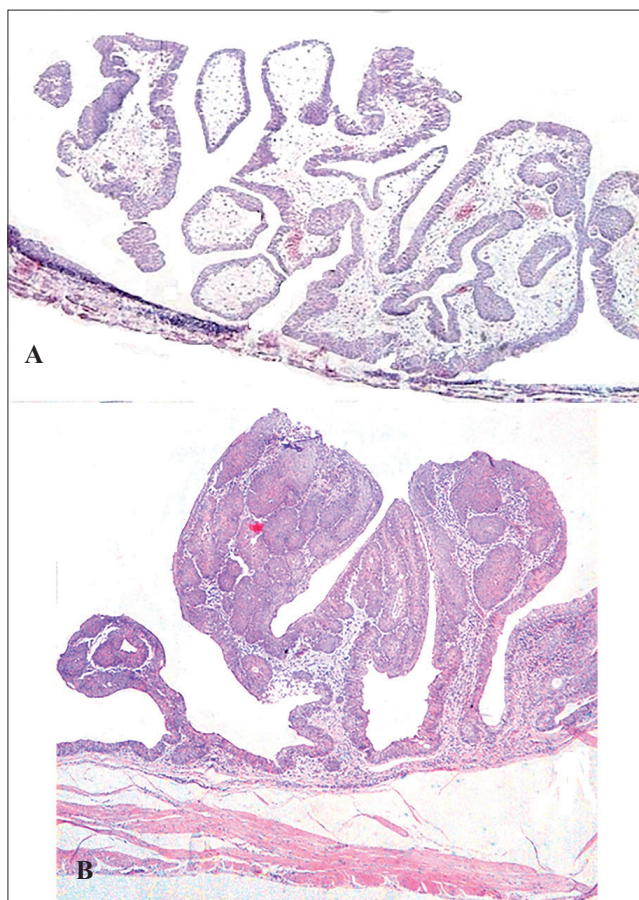


Figura 37 – **A** e **B** - papiloma exofítico: projeções digitais de tecido transicional com um eixo fibrovascular (Grupo III - Rato 7 – 100 x, Grupo M - Rato 8 - 40 x); Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Foram observadas Lesões de Baixo Potencial Maligno (LBPM), com atipias focais (Figura 38) e/ou dúvidas sobre invasão de submucosa.

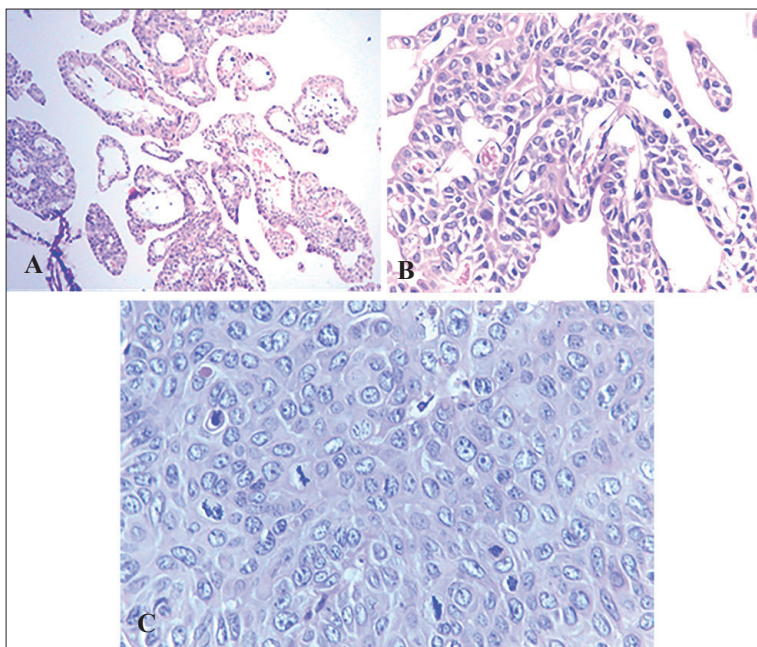


Figura 38 – **A e B** lesão exofítica papilar com raras células atípicas – 40 x e 400 x – LBPM – (Grupo I - Rato 1); **C** - células atípicas e mitoses atípicas. 400 x – LBPM – (Grupo I - Rato 6); Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.
Fonte: Elaborada pelos autores.

As neoplasias malignas observadas foram: carcinoma de células transicionais (CCT) puro; carcinoma escamoso puro; CCT com diferenciação escamosa; CCT com diferenciação glandular; CCT com diferenciação escamosa e glandular; CCT com diferenciação pseudoglandular; CCT com diferenciação oxifílica; CCT com diferenciação basalióide. Carcinoma misto: CCT + *in situ* (três tumores – Grupo III) CCT + carcinoma escamoso; CCT + adenocarcinoma; CCT + carcinoma escamoso + adenocarcinoma (Figuras 39 a 41).

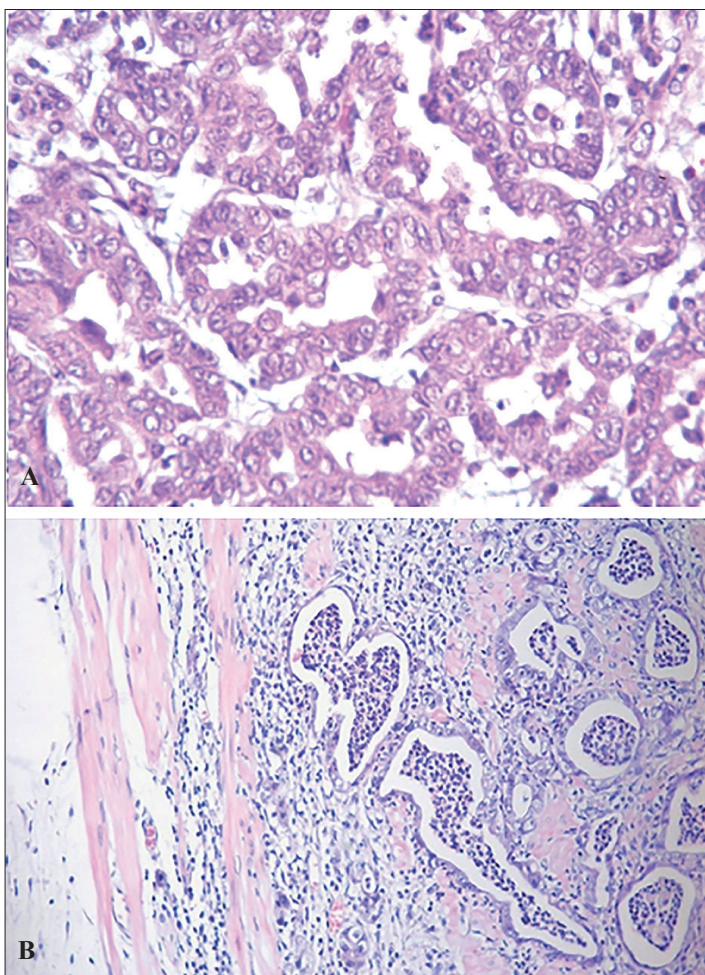


Figura 39 – **A** - CCT com diferenciação glandular, células formando estruturas glandulares, 400 x (Grupo L - Rato 1); **B** - CCT com diferenciação pseudoglandular, grupos de células tumorais com degeneração e necrose central com invasão em muscular 100 x (Grupo M - Rato 5). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.

Fonte: Elaborada pelos autores.

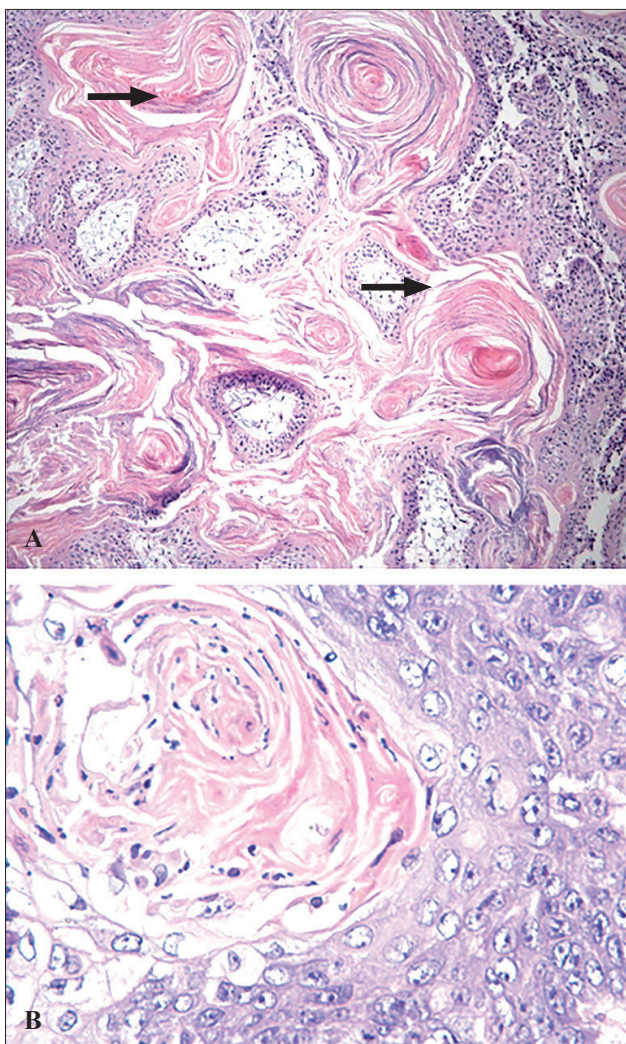


Figura 40 – **A** - CCT com diferenciação escamosa, abundante ceratina e muitas pérolas córneas (setas) 100 x (Grupo X - Rato 1); **B** - CCT com diferenciação escamosa, detalhe de uma pérola córnea 400 x (Grupo X - Rato 2). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.

Fonte: Elaborada pelos autores.

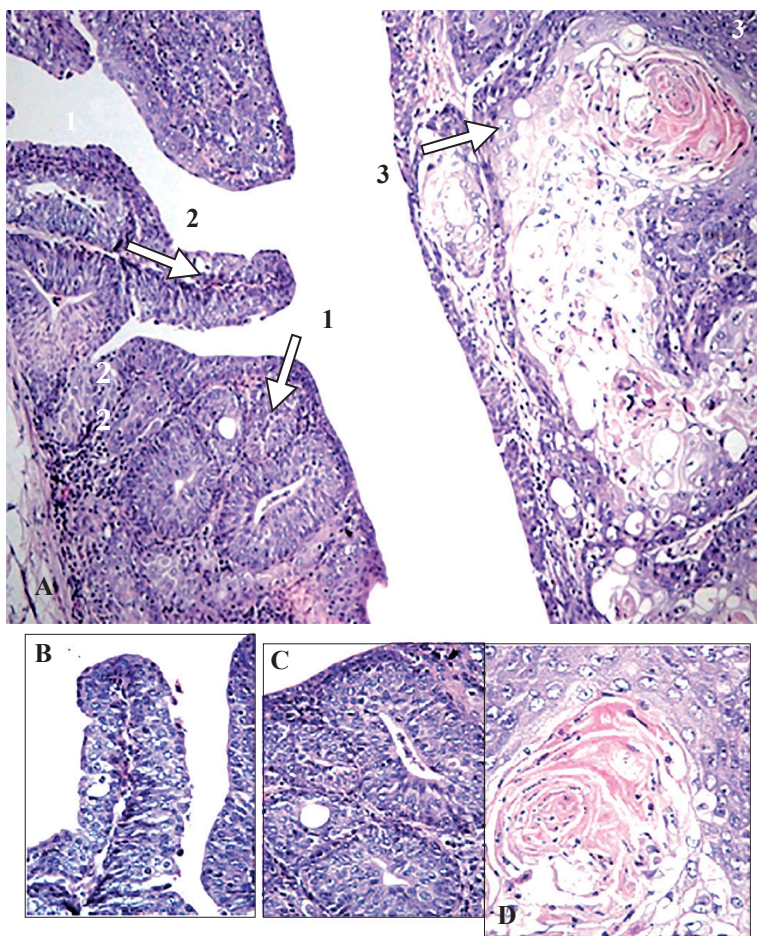


Figura 41 – A - CCT com diferenciação escamosa e glandular - formações glandulares, papilares e escamosa com pérolas, córneas (setas 1, 2 e 3) 100 x (Grupo X - Rato 2); B, C e D - Detalhes em maior aumento (400 x).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Subtipos histopatológicos de carcinomas

Avaliação dos subtipos histológicos

Nenhum dos grupos comparados apresentou diferença estatística significativa quanto aos subtipos histopatológicos considerados como CCT puro e outros.

Os subtipos de carcinomas identificados foram: carcinoma de células transicionais (CCT) puro; carcinoma de células escamosas puro; CCT com diferenciação escamosa; CCT com diferenciação glandular; CCT com diferenciação escamosa e glandular; CCT com diferenciação pseudoglandular; CCT com diferenciação oxifilica; carcinoma misto: CCT + *in situ*; CCT + carcinoma escamoso; CCT + carcinoma escamoso + adenocarcinoma.

A seguir, estão as tabelas descritivas de: número de ratos com subtipos histológicos de carcinomas (Tabela 15); número de subtipos histológicos de carcinomas por grupo (Tabela 16); número de bexigas com 1, 2, 3, 4 e 5 carcinomas (Tabela 17); correlação do subtipo histológico de carcinomas x invasão da parede vesical (Tabela 18); correlação do subtipo histológico de carcinomas x diferenciação histológica e atípicas (Tabela 19).

Tabela 15 – Número de ratos com subtipos histológicos de carcinomas.

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS													
CARCINOMAS													
G	N	Número de ratos c/ carcinomas Nº, %	NÚMERO DE RATOS COM SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMAS										MISTO: CCT + N ^o , %
			PURO N ^o , %			CCT C/ DIF.N ^o , %							
			CCT	ESC	ADEN	ESC	GLAN	ESC/ GLAN	PSEU/ GLAN	ESC	ADEN	ESC/ ADEN	
I	10	2	20,0	1 (50,0)	0	0	1 (50,0)	0	0	0	0	0	0
IIA	07	2	28,5	1 (50,0)	0	0	0	0	0	0	1 (50,0)	0	0
IIB	06	1	16,6	1 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	17	11	64,7	5 (45,4)	1 (9,09)	0	5 (45,4)	0	0	0	1 (9,0)	0	1 (9,1)
X	5	5	100,0	2 (40,0)	1 (20,0)	0	4 (80,0)	1 (20,0)	0	0	1 (20,0)	0	0
XI	6	0	00,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XII	6	0	00,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XIII	6	0	00,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	12	8	66,6	3 (37,5)	1 (12,5)	0	2 (25,0)	1 (12,5)	0	1 (12,5)	2 (25,0)	0	0
L	9	7	77,7	2 (28,5)	1 (14,2)	0	4 (57,1)	0	0	0	0	0	0
M	10	9	90,0	2 (22,2)	2 (22,2)	0	6 (66,6)	0	1 (11,1)	3 (33,3)	1 (11,1)	0	0
N	12	8	66,6	4 (50,0)	5 (62,5)	0	1 (12,5)	0	0	1 (12,5)	1 (12,5)	0	0

Fonte: Elaborada pelos autores.

G - Grupo N - ene, No Número, CCT- Carcinoma de células transitacionais, ADEN - Adenocarcinoma, CCT C/DIF - Carcinoma de células transitacionais com diferenciação, ESC / Escamoso, GLAN - Glandular, ESC/GLAN - Escamoso/glandular, PSEU/GLAN- Pseudoglandular, ESC/ADEN - Escamoso/adrenocarcinoma.

Tabela 16 – Número de subtipos histológicos de carcinomas por grupo.

Grupo	N	Nº de ratos com carci- nomas	Nº de carci- nomas por grupo	CARCINOMAS									
				NÚMERO DE SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMAS POR GRUPO									
				PURO Nº, %					CCT C/ DIF. Nº, %		MISTO: CCT + Nº		
				CCT	ESC	ADEN	ESC	GLAN	ESC/ GLAN	PSEU/ GLAN	ESC	ADEN	ESC/ ADEN
I	10	2	02	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IIA	07	2	03	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IIB	06	1	01	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	17	11	26	11	3	0	7	0	0	0	4	0	1
X	5	5	17	3	1	0	9	1	1	0	2	0	0
K	12	8	14	4	1	0	3	0	3	1	2	0	0
L	9	7	12	2	3	0	7	0	0	0	0	0	0
M	10	9	21	2	3	0	11	1	0	3	0	0	1
N	12	8	17	6	8	0	1	0	0	1	1	0	0

Fonte: Elaborada pelos autores.

N - Ene, Nº. Número, CCT - Carcinoma de células transicionais, ADEN - Adenocarcinoma, CCT C/DIF - Carcinoma de células transicionais com diferenciação, ESC/Escamoso, GLAN - Glandular, ESC/GLAN - Escamoso/glandular, PSEU/GLAN - Pseudoglandular, ESC/ADE - Escamoso e adenocarcinoma.

Tabela 18 – Número de bexigas
com 1, 2, 3, 4 e 5 carcinomas.

Grupo	N	Número carci- nomas por grupo Nº.	CARCINOMAS				
			NÚMERO DE BEXIGAS COM 1, 2, 3 4 E 5 CARCINOMAS				
			1	2	3	4	5
I	10	02	2	0	0	0	0
IIA	07	03	1	1	0	0	0
IIB	06	01	0	1	0	0	0
III	17	26	5	4	1	0	2
X	5	17	1	1	0	1	2
K	12	14	5	1	1	1	0
L	9	12	5	0	1	1	0
M	10	21	2	4	2	1	1
N	12	17	3	2	2	1	0

Fonte: Elaborada pelos autores.

N - Ene, Nº - Número.

Índice de carcinogênese calculado

Avaliação do índice de carcinogênese, conforme explicitado em métodos, levando-se em consideração a lesão de maior índice de carcinogênese de cada bexiga, calculado por rato e por grupo (Tabela 20).

Tabela 20 – Índice de carcinogênese obtido após somatório dos escores por rato e por grupo.

G	R															M	DP
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
I	10	18	15	18	36*	36*	18	18	18	15	18					21,0	08,00
IIA	07	39*	18	15	18	18	60*	18								26,5	16,83
IIB	06	15	15	26*	9	9	9									13,8	06,64
III	17	18	18	Ex	95*	30*	64*	15	72*	18	42*					40,4	24,43
		60*	18	72*	18	Ex	34*	48*	Ex	24*	42*						
X	05	66*	93*	81*	60*	54*	Ex									70,8	15,95
K	12	18	63*	Ex	72*	36*	15	26*	15	18	54*	48*	63*	48*		39,6	20,96
L	09	48*	83*	15	Ex	63*	15	Ex	Ex	36*	48*	123*	30*			51,2	34,69
M	10	90*	48*	15	33*	78*	Ex	108*	72*	78*	36*	66*	Ex			62,4	28,76
N	12	90*	15	48*	90*	Ex	26*	18	18	81*	102*	123*	15	54*		56,6	39,02

* lesão maligna.
G - Grupo; R - Rato; N - Número efetivo de ratos; M - média; DP - Desvio Padrão;
Ex – excluído.
Fonte: Elaborada pelos autores.

Comparando-se o índice de carcinogênese obtido nos grupos K e X, constatou-se que o grupo X obteve maior índice de carcinogênese estatisticamente significativa em relação ao grupo K (Figura 42). Observam-se, na Tabela 20, os dados utilizados.

Comparando-se os grupos K, X, I e III, observou-se que o grupo X apresentou índice de carcinogênese maior, estatisticamente significativa, em relação aos demais grupos (Figura 43).

Ao avaliar comparativamente o índice de carcinogênese dos grupos I e K, constatou-se que o grupo I obteve menor índice de carcinogênese, estatisticamente significativa, em relação ao grupo K (Figura 44).

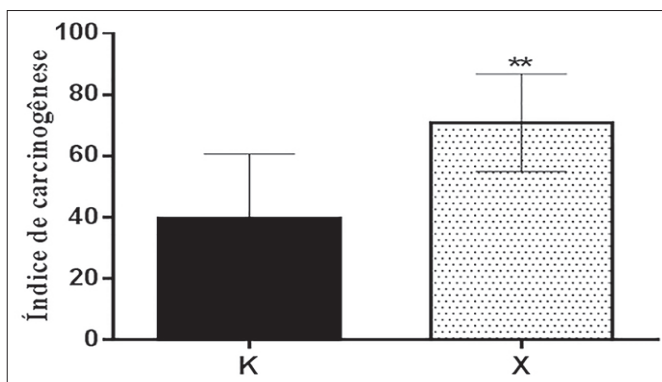


Figura 42 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K e X. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K e cinco ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste t para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo X ($70,800 \pm 15,959$) foi significativamente maior (** $P = 0,0097$) que o mensurado no grupo K ($39,667 \pm 20,965$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

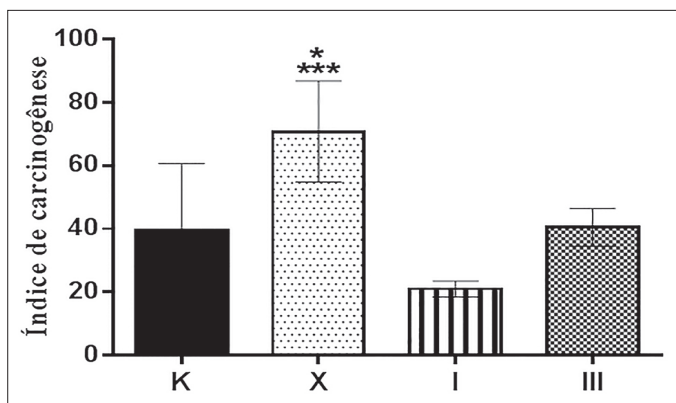


Figura 43 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K, X, I e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, cinco do grupo X, dez do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo X ($70,800 \pm 15,959$) foi significativamente maior que o mensurado nos grupos K ($39,667 \pm 20,965$; $P < 0,05$), I ($21,000 \pm 8,000$; $P < 0,001$) e III ($40,471 \pm 24,436$; $P < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

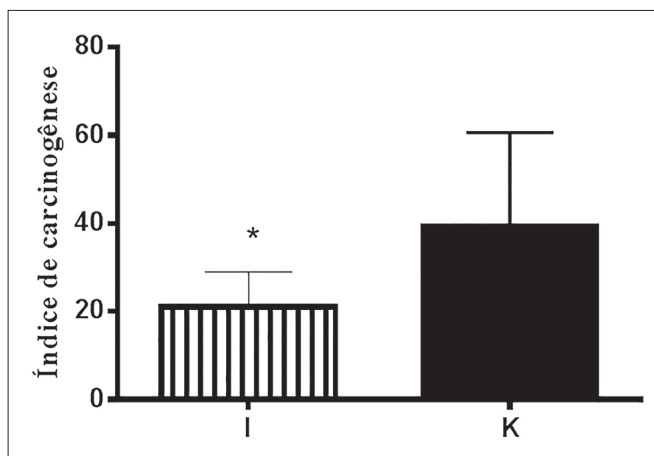


Figura 44 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e K. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em dez animais do grupo I e 12 ratos do grupo K. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste t para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo I ($21,000 \pm 8,000$) foi significativamente menor que o mensurado no grupo K ($39,667 \pm 20,965$; $P = 0,0153$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Ao avaliar o índice de carcinogênese dos grupos I e III, constatou-se que o grupo I obteve menor índice de carcinogênese, estatisticamente significativo, em relação ao grupo K (Figura 45).

Na comparação dos índices de carcinogênese de animais que receberam a administração intragástrica de própolis grupo III e o grupo controle K não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 46).

Na comparação dos índices de carcinogênese de animais que receberam a administração subcutânea de própolis (IIA) e água (IIB) não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 47).

Na comparação dos grupos IIA e III, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação ao índice de carcinogênese (Figura 48).

E, por fim, avaliando-se os índices de carcinogênese dos grupos K, L, M, N, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre eles (Figura 49).

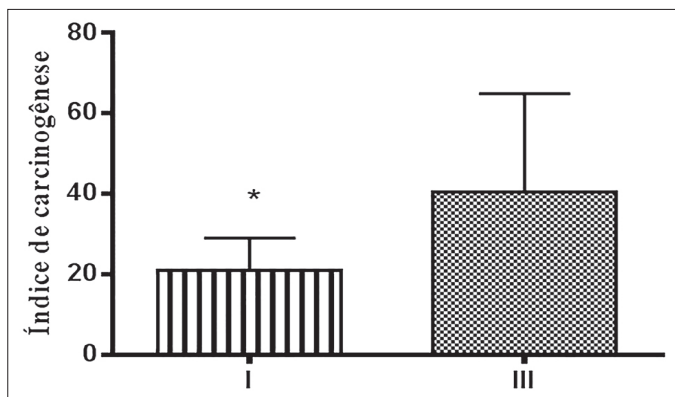


Figura 45 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em dez animais do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo I ($21,000 \pm 8,000$) foi significativamente menor que o mensurado nos grupos III ($40,471 \pm 24,436$; $P = 0,022$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

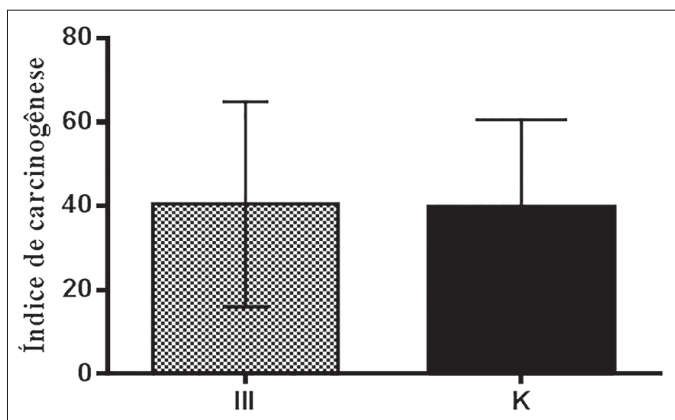


Figura 46 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos III e K. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 17 animais do grupo III e 12 ratos do grupo K. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos III ($40,471 \pm 24,435$) e K ($39,667 \pm 20,965$; $P = 0,927$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

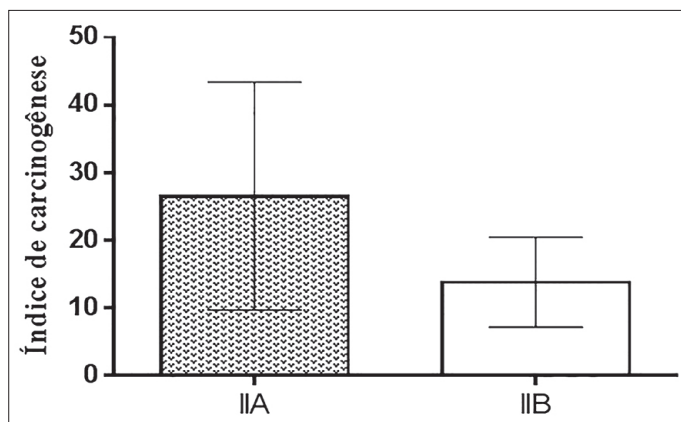


Figura 47 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e IIB. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em sete animais do grupo IIA e seis ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e IIB ($13,833 \pm 6,646$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

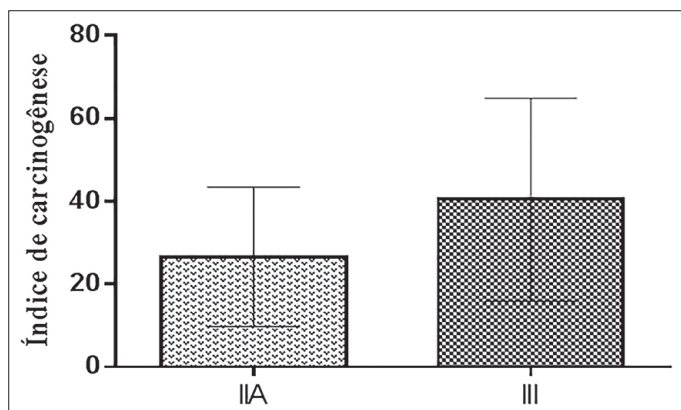


Figura 48 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em sete animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1850$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e III ($40,471 \pm 24,436$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

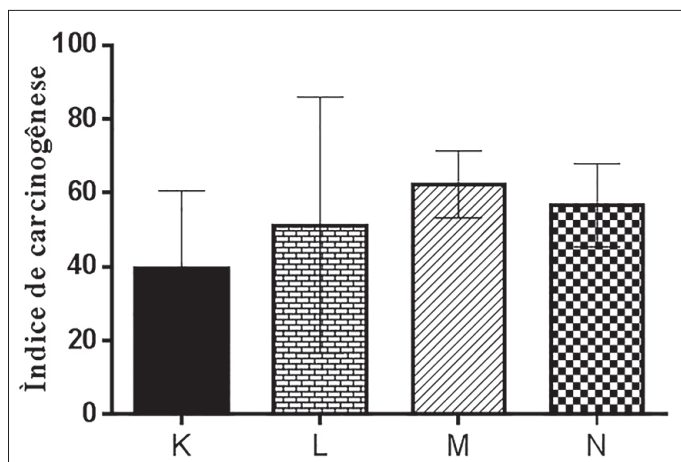


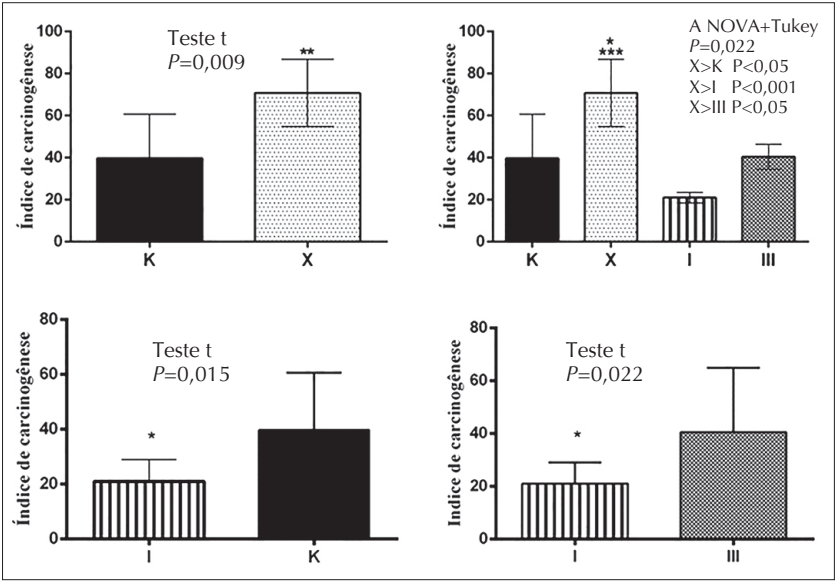
Figura 49 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K, L, M e N. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, nove do grupo L, dez do grupo M e 12 ratos do grupo N. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA: $F = 1,0669$; $P = 0,3743$).

Abaixo, na Tabela 18, os valores de parâmetros utilizados.

Fonte: Elaborada pelos autores.

No Quadro 2, a seguir, pode ser observada a síntese dos valores significantes encontrados.

Quadro 2 – Síntese dos resultados estatisticamente significantes observados no IC.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas

Incidência de Hiperplasias, Papilomas, Lesão de Baixo Potencial Maligno e Carcinomas (Tabela 21).

Tabela 21 – Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas: Incidência de Hiperplasias, Papilomas, Lesão de Baixo Potencial Maligno e Carcinomas.

G	Tratamento	Nº	Histopatologia Incidência (%)													
			HPS		HPP		HPN		PAP		LBPM		CARC			
I	BBN/P/L P um mês antes	10	8	80,0	9	90,0	2	20,0	9	90,0	6	60,0	2	20,0		
IIA	BBN/P/L Subcutâneo	07	5	71,4	5	71,4	2	28,5	5	71,4	4	57,1	2	28,5		
IIB	BBN/H ₂ O Subcutâneo	06	6	100,0	5	83,3	0	00,0	4	66,6	0	00,0	1	16,6		
III	BBN/P/L intragástrica	17	15	88,2	15	88,2	7	41,1	16	94,1	13	74,4	11	64,7		
X	BBN/L intragástrica	5	4	80,0	3	60,0	2	40,0	3	60,0	3	60,0	5	100,0		
K	BBN	12	10	83,3	10	83,3	5	41,6	9	75,0	3	25,0	8	66,6		
L	BBN/LL	9	8	88,8	7	77,7	3	33,3	8	88,8	1	11,1	7	77,7		
M	BBN/Cel	10	10	100,0	10	100,0	7	70,0	10	100,0	4	40,0	9	90,0		
N	BBN/PP/LL	12	10	83,3	11	91,6	4	33,3	10	83,3	6	50,0	8	66,6		

Fonte: Elaborada pelos autores.

G - Grupo; Nº - número efetivo de ratos; HPS - Hiperplasia simples; HPP - Hiperplasia papilar; HPN - Hiperplasia nodular; PAP - Papiloma; L.B.P.M. - Lesão de baixo CARC - Carcinoma; BBN/P/L - BBN e própolis extraída em lisina; BBN/L - BBN e lisina; P - Própolis; L - Lisina; LL - Dupla dose de lisina; PPLL - Dupla dose de própolis extraída em lisina; Cel - Celecoxibe.

Avaliação estatística da incidência de carcinoma de bexiga

As avaliações estatísticas a seguir correspondem aos dados brutos obtidos da tabela anterior (Tabela 21).

Comparando-se os grupos quanto à incidência de carcinoma, dois a dois, observou-se uma menor proporção de incidência de carcinomas para o grupo I, estatisticamente significativa, em relação ao grupo K, e do grupo I em relação ao grupo III (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22 – Incidência de carcinoma nos grupos K e I. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que evidenciou diferença estatisticamente significativa ($*P = 0,0427$) entre os grupos K e I em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
K	8 (66,67%)*	4	12
I	2 (20%)	8	10
Total	10	12	22

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 23 – Incidência de carcinoma nos grupos I e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que evidenciou diferença estatisticamente significativa ($*P = 0,0461$) entre os grupos I e III em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
I	2 (20,00%)	8	10
III	11 (64,71%)*	6	17
Total	13	14	27

Fonte: Elaborada pelos autores.

Comparando-se os grupos quanto à incidência de carcinoma dois a dois observou-se uma maior proporção de incidência de carcinomas para o grupo X, estatisticamente significativa, em relação ao grupo IIA (Tabela 24).

Tabela 24 – Incidência de carcinoma nos grupos X e IIA. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0278$) entre os grupos X e IIA em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
X	5 (100,00%)*	0	5
IIA	2 (28,57%)	5	7
Total	7	5	12

Fonte: Elaborada pelos autores.

A comparação entre os demais grupos dois a dois (K e X, X e III, K e III, IIA e IIB) e dos grupos K, L, M e N entre si não mostraram diferenças estatisticamente significantes quanto à incidência de carcinomas (Tabelas 25 a 30).

Tabela 25 – Incidência de carcinoma nos grupos K e X. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,2605$) entre os grupos K e X em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
K	8 (66,67%)	4	12
X	5 (100,00%)	0	5
Total	13	4	17

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 26 – Incidência de carcinoma nos grupos X e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,2663$) entre os grupos X e III em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
X	5 (100,00%)	0	5
III	11 (64,71%)	6	17
Total	16	6	22

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 27 – Incidência de carcinoma nos grupos K e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 1,0000$) entre os grupos K e III em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
K	8 (66,67%)	4	12
III	11 (64,71%)	6	17
Total	19	10	29

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 28 – Incidência de carcinoma nos grupos IIA e IIB. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 1,0000$) entre os grupos IIA e IIB em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
IIA	2 (28,57%)	5	7
IIB	1 (16,67%)	5	6
Total	3	10	13

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 29 – Incidência de carcinoma nos grupos IIA e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,1819$) entre os grupos IIA e III em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
IIA	2 (28,57%)	5	7
III	11 (64,71%)	6	17
Total	13	11	24

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 30 – Incidência de carcinoma nos grupos K, L, M e N. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,5547$) entre os grupos K, L, M e N em relação à proporção de animais que desenvolveram carcinomas.

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
K	8 (66,67%)	4	12
L	7 (77,78%)	2	9
M	9 (90%)	1	10
N	8 (66,67%)	4	12
Total	32	11	43

Fonte: Elaborada pelos autores.

Avaliação da multiplicidade de carcinoma: (número de carcinomas por bexiga)

Os dados de multiplicidade, invasão e classificação por atipias encontram-se na Tabela 31.

Tabela 31 – Multiplicidade de carcinomas (número de carcinomas por bexiga) com classificação por invasão e atipias.

G	Tratamento	NÚMERO DE CARCINOMAS (%)									
		Nº (%)		MULTIPLI CIDADE Nº carc/ rato Mediana (min-max)	T. CARC	Classificação por invasão				Classificação por atipias	
		Nº	RATOS C/			CARC	SM	MUS	S/P/M	BAIXO GRAU	ALTO GRAU
I	BBN/P/L P um mês antes	10	2	020,0	0 (0-1)	02	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0)	1 (50,00)	1 (50,0)
IIA	BBN/P/L subcutâneo	07	2	028,5	0 (0-2)	03	2 (66,6)	1 (33,3)	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,6)
IIB	BBN/H ₂ O subcutâneo	06	1	016,6	0 (0-2)	02	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	2 (100,0)	0 (0)
III	BBN/P/L intra gástrica	17	11	064,7	1(0-5)	26	13 (50,0)	6 (23,0)	7 (26,9)	6 (23,0)	20 (76,9)
X	BBN/L intra gástrica	05	5	100,0	4 (1-6)	17	05 (29,4)	1 (05,8)	11 (64,7)	6 (35,2)	11 (64,7)
K	BBN	12	8	66,6	1 (0-4)	14	09 (64,2)	4 (28,5)	1 (7,1)	3 (21,4)	11 (78,5)
L	BBN/LL	09	7	077,7	1 (0-4)	12	04 (33,3)	4 (33,3)	4 (33,3)	1 (08,3)	11 (91,6)
M	BBN/Cel	10	9	090,0	2 (0-5)	21	07 (33,3)	7 (33,3)	7 (33,3)	3 (14,2)	18 (85,7)
N	BBN/PP/LL	12	8	066,6	1 (0-4)	17	05 (29,4)	4 (23,5)	8 (47,0)	3 (17,6)	14 (82,3)

G - Grupo, Nº Número de ratos; CARC - Carcinoma; SM - Submucosa; MUS - Muscular; S/P/M Serosa, peritônio e metástase; CCT - Carcinoma de células transicionais; BBN/P/L - BBN e própolis extraída em lisina; BBN/L - BBN e lisina; P - Própolis; L - Lisina, LL - Dupla dose de lisina; PPLL - Dupla dose de própolis extraída em lisina; Cel – celecobixe.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Avaliando-se a multiplicidade de carcinoma (número de carcinomas por bexiga), comparando-se os grupos K e X, observou-se uma maior multiplicidade de Carcinomas (C) do grupo X em relação ao grupo K, estatisticamente significativa (Figura 50).

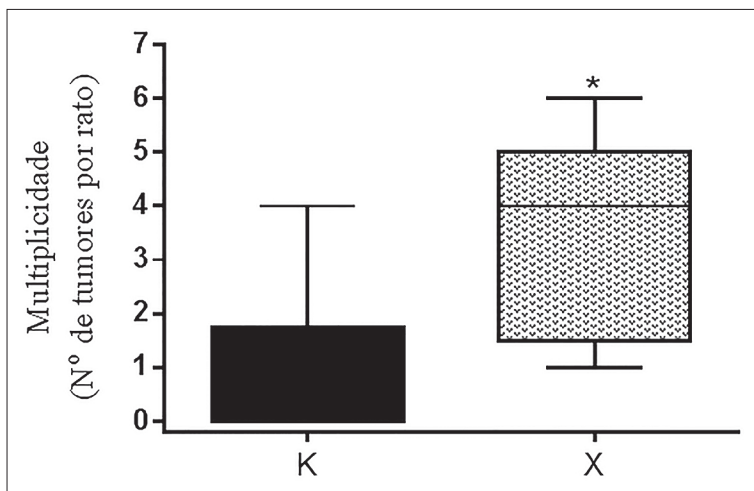


Figura 50 – Avaliação da multiplicidade de carcinomas nos grupos K e X. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K e cinco ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste *U* de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Constatou-se que a multiplicidade de C verificada no grupo X (4,000; IQ: 1,500 – 5,000) foi significativamente maior (**P* = 0,0267) que a mensurada no grupo K (1,000; IQ: 0,000 – 1,750).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Avaliando-se a multiplicidade de carcinoma, comparando-se os grupos K, X, I e III, observou-se que a multiplicidade (número de C por bexiga) do grupo X é estatisticamente significante maior que a mensurada no grupo I (Figura 51).

Os parâmetros utilizados para comparação da multiplicidade de C (número de carcinomas por bexiga) dos grupos K, X, I e III estão na Tabela 32.

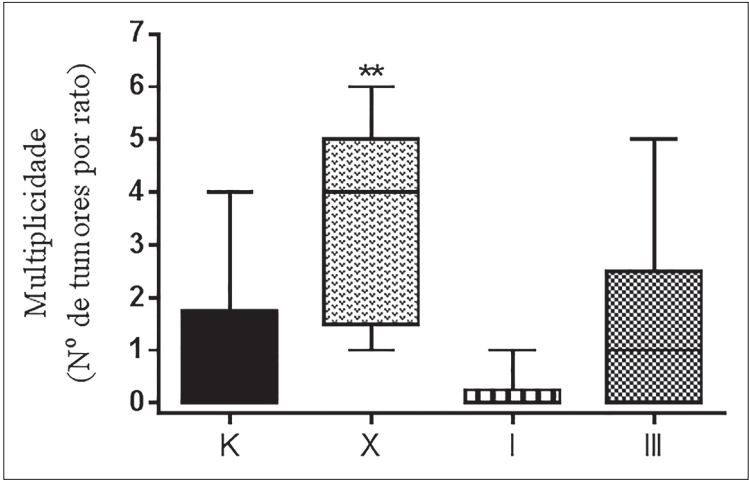


Figura 51 – Avaliação da multiplicidade de C nos grupos K, X, I e III. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, cinco do grupo X, dez do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Constatou-se que a multiplicidade verificada no grupo X foi significativamente maior (** $P < 0,01$; teste de Dunn) que a mensurada no grupo I.
Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 32 – Parâmetros utilizados na comparação dos grupos K, X, I e III para avaliação da multiplicidade de carcinomas.

Parâmetro	Grupo K	Grupo X	Grupo I	Grupo III
Mínimo	0,000	1,000	0,000	0,000
Percentil 25	0,000	1,500	0,000	0,000
Mediana	1,000	4,000	0,000	1,000
Percentil 75	1,750	5,000	0,250	2,500
Máximo	4,000	6,000	1,000	5,000

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na avaliação de multiplicidade de carcinomas comparativa entre os grupos IIA e IIB, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, conforme observado na Figura 52.

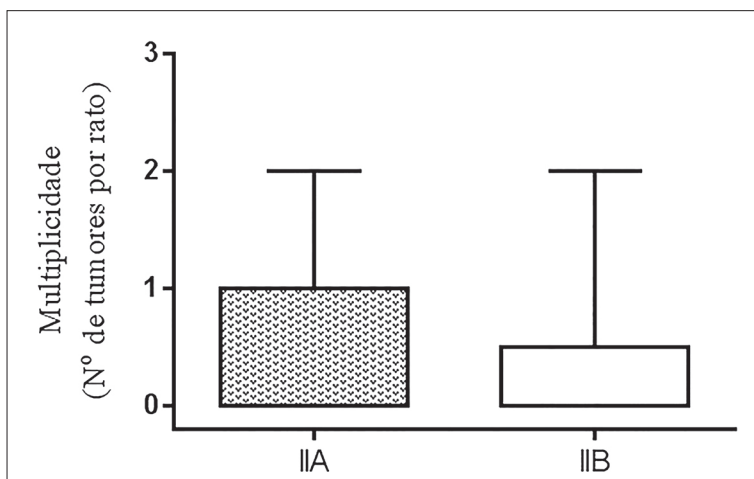


Figura 52 – Avaliação da multiplicidade de carcinomas nos grupos IIA e IIB. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em sete animais do grupo IIA e seis ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste *U* de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,7714$) entre os grupos IIA (0,000; IQ: 0,000 – 1,000) e IIB (0,000; IQ: 0,000 – 0,500).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Comparando-se os grupos IIA e III, I e IIA e entre os grupos K, L, M e N, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, conforme pode ser observado nas Figuras 53 e 54.

Os valores dos parâmetros utilizados na comparação quanto à multiplicidade de C entre os grupos K, L, M e N estão na Tabela 33.

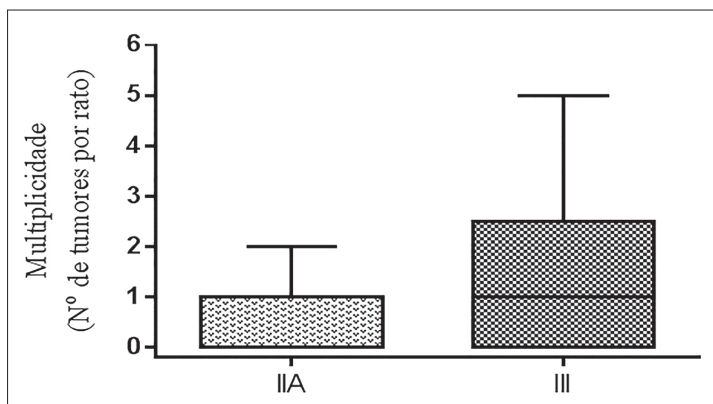


Figura 53 – Avaliação da multiplicidade de carcinoma nos grupos IIA e III. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em sete animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste *U* de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0993$) entre os grupos IIA (0,000; IQ: 0,000 – 1,000) e IIB (1,000; IQ: 0,000 – 2,500).

Fonte: Elaborada pelos autores.

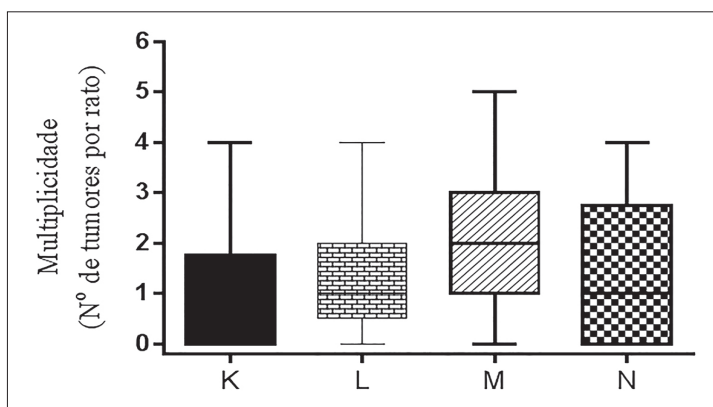


Figura 54 – Avaliação da multiplicidade de carcinomas nos grupos K, L, M e N. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, cinco do grupo X, dez do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (estatística de Kruskal-Wallis = 3,4240; $P = 0,3308$).

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 33 – Parâmetros utilizados na comparação dos grupos K, L, M e N para avaliação da multiplicidade de carcinomas.

Parâmetro	Grupo K	Grupo L	Grupo M	Grupo N
Mínimo	0,000	0,000	0,000	0,000
Percentil 25	0,000	0,500	1,000	0,000
Mediana	1,000	1,000	2,000	1,000
Percentil 75	1,750	2,000	3,000	2,750
Máximo	4,000	4,000	5,000	4,000

Fonte: Elaborada pelos autores.

Grau de invasão

Nesta avaliação, foram utilizados os dados absolutos obtidos de todos os carcinomas presentes em cada bexiga, por grupo, encontrando-se na Tabela 28, e se referem à invasão de parede e à atipia celular. Os dados não obedeceram à curva de distribuição normal, sendo avaliados estatisticamente como dados não paramétricos.

Considerando o grau de invasão classificado como submucosa (SM), muscular (MUS) e serosa, peritônio e metástase (S/P/M), todos os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado.

Na comparação dos grupos K e X, observou-se que a proporção de tumor com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo K em relação ao grupo X e com grau de invasão de SM e MUS significativamente maior no grupo K (Tabela 34).

Na comparação dos grupos X e III, a proporção de tumores com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo X e com grau de invasão SM e MUS significativamente maior no grupo III (Tabela 35).

Tabela 34 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos K e X. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado que evidenciou diferença estatisticamente significativa (** $P = 0,0039$) entre os grupos K e X em relação ao grau de invasão.

Pode-se concluir que a proporção de tumores com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo X e com grau de invasão SM e MUS foi significativamente maior no grupo K.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)**	4 (28,57%)**	1 (7,14%)	14
X	5 (29,41%)	1 (5,88%)	11 (64,71%)**	17
Total	14	5	12	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 35 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos X e III. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado que evidenciou diferença estatisticamente significativa (* $P = 0,0495$) entre os grupos X e III em relação ao grau de invasão.

Pode-se concluir que a proporção de tumores com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo X e com grau de invasão SM e MUS foi significativamente maior no grupo III.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
X	5 (29,41%)	1 (5,88%)	11 (64,71%)*	17
III	13 (50,00%)*	6 (23,08%)*	7 (26,92%)	26
Total	18	7	18	43

Fonte: Elaborada pelos autores.

Na comparação dos grupos K e III, dos grupos K, L, M e N entre si, dos grupos K e L e dos grupos K e M, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de invasão (Tabelas 36 a 40).

Tabela 36 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos K e III. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,3283$) entre os grupos K e III em relação ao grau de invasão.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)	4 (28,57%)	1 (7,14%)	14
III	13 (50,00%)	6 (23,08%)	7 (26,92%)	26
Total	22	10	8	40

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 37 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos K, L, M e N. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,2903$) entre os grupos em relação ao grau de invasão.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)	4 (28,57%)	1 (7,14%)	14
L	4 (33,33%)	4 (33,33%)	4 (33,33%)	12
M	7 (33,33%)	7 (33,33%)	7 (33,33%)	21
N	5 (29,41%)	4 (23,53%)	8 (47,06%)	17
Total	25	19	20	64

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 38 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos K e L. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,1661$) entre os grupos em relação ao grau de invasão.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)	4 (28,57%)	1 (7,14%)	14
L	4 (33,33%)	4 (33,33%)	4 (33,33%)	12
Total	13	8	5	26

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 39 – Grau de invasão do carcinoma nos grupos K e M. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,1141$) entre os grupos em relação ao grau de invasão.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)	4 (28,57%)	1 (7,14%)	14
M	7 (33,33%)	7 (33,33%)	7 (33,33%)	21
Total	16	11	8	35

Fonte: Elaborada pelos autores.

No entanto, ao comparar os grupos K e N, observou-se que a proporção de tumores com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo N e com grau de invasão SM foi significativamente maior no grupo K (Tabela 40).

Tabela 40 – Grau de invasão nos grupos K e N. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado que evidenciou diferença estatisticamente significativa ($*P = 0,0417$) entre os grupos K e N em relação ao grau de invasão. Pode-se concluir que a proporção de tumores com grau de invasão S/P/M foi significativamente maior no grupo N e com grau de invasão SM foi significativamente maior no grupo K.

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)*	4 (28,57%)	1 (7,14%)	14
N	5 (29,41%)	4 (23,53%)	8 (47,06%)*	17
Total	14	8	9	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Grau de atipias

Nesta avaliação, foram utilizados os dados de número de carcinomas existentes em cada bexiga por grupo (Tabela 31 em página anterior).

Nas comparações entre os grupos K e X, K e III, X e III e K, L M e N dois a dois não ocorreram diferenças estatisticamente significantes.

Grau de diferenciação

Foi considerado como grau de diferenciação como Bem Diferenciado (BD), Moderadamente Diferenciado (MD) e Indiferenciado (IND). Todos os dados foram analisados pelo teste qui-quadrado. E os subtipos histopatológicos, teste exato de Fisher. Nesta análise foram utilizados os dados do número de carcinomas presentes em cada bexiga, por grupo (Tabela 41).

Tabela 41 – Multiplicidade de carcinomas (número de carcinomas por bexiga) com classificação por diferenciação e subtipos histopatológicos.

G	Tratamento	Nº de ratos	Nº (%) RATOS C/ CARCINOMA	T CAR	CARCINOMAS Nº e %					
					CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO			SUBTIPO HISTOPATOLÓGICO		
					BD	MD	IND	CCT Puro	OUTROS	
I	BBN/P/L P um mês antes	10	2 020,0	02	01 (50,0)	01 (50,0)	0 (0)	01 (50,0)	01 (50,0)	
IIA	BBN/P/L subcutâneo	07	2 028,5	03	01 (33,3)	0 (0)	02 (66,6)	02 (66,6)	01 (33,3)	
IIB	BBN/H ₂ O subcutâneo	06	1 016,6	02	02 (100,0)	0 (0)	0 (0)	02 (100,0)	0 (0)	
III	BBN/P/L intragástrica	17	11 064,7	26	06 (23,0)	06 (23,0)	14 (53,8)	14 (53,8)	12 (46,1)	
X	BBN/L intragástrica	05	5 100,0	17	01 (05,8)	11 (64,7)	05 (29,4)	04 (23,5)	13 (76,4)	
K	BBN	12	8 066,6	14	02 (64,2)	08 (28,5)	04 (28,5)	4 (28,5)	10 (71,4)	
L	BBN/LL	09	7 077,7	12	0(0)	08 (66,6)	04 (33,3)	1 (08,3)	11 (91,6)	
M	BBN/Cel	10	9 090,0	21	03(14,2)	10 (47,6)	08 (38,0)	02 (09,5)	19 (90,4)	
N	BBN/PP/LL	12	8 066,6	17	0(0)	10(58,8)	07(41,1)	06 (35,2)	11 (64,7)	

Fonte: Elaborada pelos autores.

G - Grupo, Nº Número de ratos, T - Total, CAR – Carcinoma BD - Bem Diferenciado, MD - Moderadamente Diferenciado, IND - Indiferenciado, CCT - Carcinoma de células transitacionais, BBN/P/L - BBN e própolis extraída em lisina, BBN/L - BBN e lisina, P - Própolis, L - Lisina, LL - Dupla dose de lisina, PLL - Dupla dose de própolis extraída em lisina, Cel - Celecoxibe.

Desta avaliação, apenas dois grupos, quando comparados, mostraram diferenças estatisticamente significantes: o grupo X com o grupo III (Tabela 42). As demais comparações não evidenciaram diferenças estatísticas significantes (Tabelas 43 a 48).

Tabela 42 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos X e III: BD (Bem Diferenciado), MD (Moderadamente Diferenciado), IND (Indiferenciado). Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que evidenciou diferença estatisticamente significativa (** $P = 0,0206$) entre os grupos X e III em relação ao grau de diferenciação histopatológica. Pode-se concluir que a proporção de tumores com grau moderadamente diferenciado foi significativamente maior no grupo X.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
X	01 (05,88) **	11 (64,70)**	05 (29,41)	17
III	06 (23,07) **	06 (23,07)**	14 (53,84)	26
Total	7	17	19	43

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 43 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e X. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,7284$) entre os grupos K e X em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
X	1(05,88)	11(64,70)	5(29,41)	17
Total	3	19	9	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 44 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e III. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,09$) entre os grupos K e III em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
III	6(23,07)	6(23,07)	14(53,84)	26
Total	8	14	18	40

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 45 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K, L, M e N. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,06$) entre os grupos K, L, M e N em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
L	0	8(28,57)	4(28,57)	12
M	3(14,28)	10(47,61)	8(38,09)	21
N	0	10(58,82)	7(41,17)	17
Total	05	36	23	64

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 46 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e L. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,39$) entre os grupos K e L em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
L	0	8(28,57)	4(28,57)	12
Total	2	16	8	26

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 47 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e M. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,83$) entre os grupos K e M em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
M	3(14,28)	10(47,61)	8(38,09)	21
Total	5	18	12	35

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 48 – Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e N: Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,14$) entre os grupos K e N em relação ao grau de diferenciação.

Grupo	Grau de diferenciação			Total
	BD	MD	IND	
K	2(64,28)	8(28,57)	4(28,57)	14
N	0	10(58,82)	7(41,17)	17
Total	2	18	11	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Análise estatística do número de carcinomas e sua classificação por subtipos histopatológicos

Os testes estatísticos não evidenciaram significância (Tabelas 49 a 55).

Tabela 49 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K e X. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 1$) entre os grupos K e X em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
X	4 (23,52)	13 (76,47)	17
Total	8	23	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 50 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($*P = 0,1860$) entre os grupos K e III em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
III	14 (53,84)	12 (46,15)	26
Total	18	22	40

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 51 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos X e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,34$) entre os grupos X e III em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
X	04 (23,52)	13 (76,47)	17
III	14 (53,84)	12 (46,15)	26
Total	18	25	43

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 52 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K, L, M e N. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,13$) entre os grupos K, L, M e N em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
L	1 (08,33)	11 (91,66)	12
M	02 (09,52)	19 (90,47)	21
N	06 (35,29)	11 (64,70)	17
Total	13	51	64

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 53 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K e L. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,33$) entre os grupos K e L em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
L	1 (08,33)	11 (91,66)	12
Total	5	21	26

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 54 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K e L. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,19$) entre os grupos K e L em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
M	02 (09,52)	19 (90,47)	21
Total	6	29	35

Fonte: Elaborada pelos autores.

Tabela 55 – Subtipos histopatológicos de carcinomas nos grupos K e N. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 1$) entre os grupos K e N em relação aos subtipos de carcinomas.

Grupo	Subtipos histopatológicos		Total
	CCT puro	Outros	
K	4 (28,57)	10 (71,42)	14
N	06 (35,29)	11 (64,70)	17
Total	10	21	11

Fonte: Elaborada pelos autores.

A VALIDAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGENESE

Em nosso estudo, após calcularmos o Índice de Carcinogênese para cada bexiga e para cada grupo, os dados foram submetidos a análise estatística, e os resultados foram comparados com os obtidos da análise estatística de parâmetros padronizados na histopatologia dos tumores malignos.

Os resultados, estatisticamente significantes, bem como os não significantes obtidos no Índice de Carcinogênese, foram semelhantes aos resultados estatisticamente significantes e não significantes obtidos na comparação entre os mesmos grupos, em parâmetros já consagrados, tais como a incidência, multiplicidade e grau de invasão (Quadro 3).

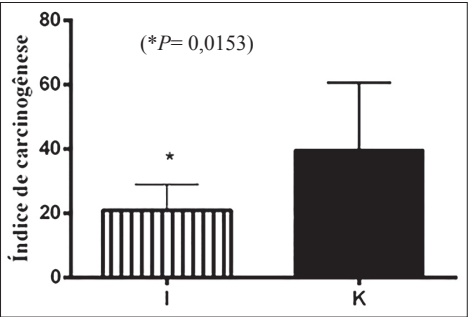
Ou seja, quando comparamos os resultados estatisticamente significantes obtidos quanto ao Índice de Carcinogênese entre os grupos I e K; I e III; K e X; K, X, I e III, observa-se semelhança nos resultados estatisticamente significantes obtidos na comparação entre os grupos quanto à incidência entre I e K, I e III e a multiplicidade na comparação entre os grupos X e K, bem como no grau de invasão dos tumores na comparação entre os grupos K e X.

Revisando a literatura, encontramos um trabalho publicado por Squirre et al., de 1977, no qual os autores estudaram os efeitos do ácido 13-cis-retinoico na carcinogênese de bexiga induzida pelo N-Metil-N-Nitrosourea (MNU) os quais estabeleceram um sistema de escore isolado para lesões, nas comparações dos grupos, tais como: hiperplasia de

0 a 5+ pelo número de células da camada e lesões polipoides de 0 a 5+, baseados no tamanho por espessura das lesões de 1 a 5mm. Consideraram ainda lesões metaplásicas quanto à quantificação na ceratinização e atipias celulares de 0 a 5+, mas este sistema de escore não foi validado e não seguiram uma análise em conjunto envolvendo os diversos parâmetros que envolvem a carcinogênese.

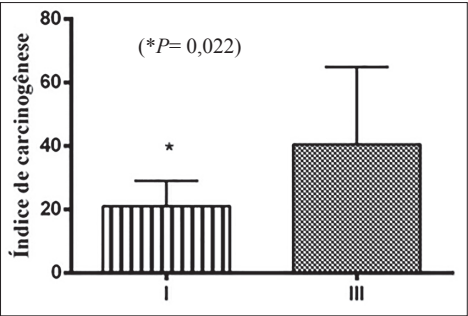
Quadro 3 – Índice de Carcinogênese *versus* parâmetros (Incidência, Multiplicidade e Grau de Invasão) cujas comparações foram estatisticamente significantes.

Índice de Carcinogênese



Incidência (***P*= 0,0427)

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
K	8 (66,6%)*	4	12
I	2 (20%)	8	10
Total	10	12	22



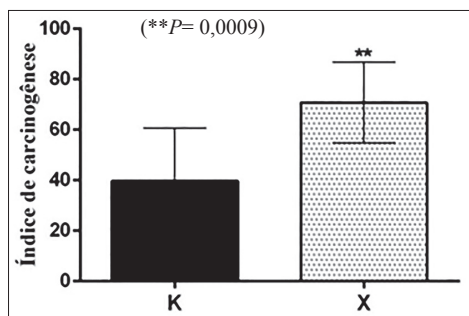
Incidência (***P*= 0,0461)

Grupo	Carcinoma		Total
	Presente	Ausente	
I	2 (20,0%)	8	10
III	11 (64,7%)*	6	17
Total	13	14	27

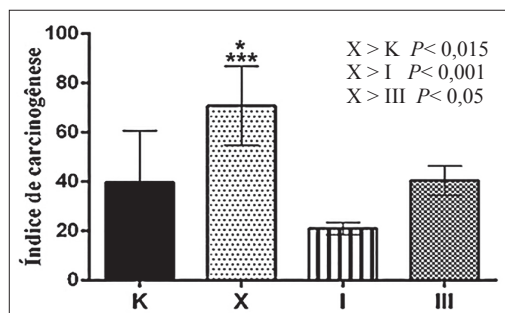
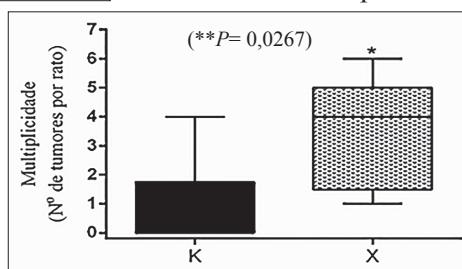
Fonte: Elaborada pelos autores.

Continuação do Quadro 3

Índice de Carcinogênese



Multiplicidade



Grau de Invasão (**P=0,0039)

Grupo	Grau de invasão			Total
	SM	MUS	S/P/M	
K	9 (64,29%)**	4 (28,57%)**	1 (7,14%)	14
X	5 (29,41%)	1 (5,88%)	11 (64,71%)**	17
Total	14	5	12	31

Fonte: Elaborada pelos autores.

Discutiremos, a seguir, os resultados à luz do Índice de Carcinogênese e demais parâmetros clássicos.

Os compostos identificados na própolis verde tratam-se de ácidos fenólicos ou de seus derivados (apenas o derivado 1 do artepillin C (Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol) estava presente e em pequena quantidade. Os demais compostos identificados foram o ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido cafeoilquínico 1, ácido 3-prenil-4-hidroxycinâmico (DORNELAS, et al., 2012b). Sabe-se que a alta capacidade de constituintes fenólicos de neutralizar espécies reativas de oxigênio está associada a sua estrutura: duplas ligações conjugadas e número de hidroxilas no anel aromático. Assim temos a explicação para a atividade antioxidante observada.

A atividade antioxidante é importante ser avaliada, uma vez que a maioria dos carcinógenos tem uma propriedade em comum: são eletrofílicos e muito reativos, apresentam átomos com deficiência de elétrons, os quais reagem em locais nucleofílicos (ricos em elétrons: DNA, RNA e proteínas) (DORNELAS, et al., 2012 a). O BBN, ao chegar no fígado, pode ser ativado pelo álcool/aldeído/desidrogenase em BCPC (seu principal metabólito) ou detoxicado pela uridina difosfato-glucoronosiltransferase, formando BBN glicuronide. BBN e BCPN são clivados em seus respectivos íons alkilcarbonium, que se ligam covalentemente ao DNA da célula da bexiga (IIDA et al., 2007).

O Nrf2 (Nuclear factor-erythroide 2-related factor 2) é um fator de transcrição contra o estresse oxidativo e eletrofílico. Ele se liga aos genes antioxidantes e detoxificantes ARE (antioxidant response elements) e EpRE (electrophile responsive elements) após heterodimerizar com a proteína Maf, e dessa interação são expressadas enzimas da fase II de detoxicação. As enzimas de detoxicação mediadas pelo Nrf2 ocorrem tanto nas células uroteliais periféricas como no fígado, aumentando a detoxicação do carcinógeno e reduzindo o estresse oxidativo, protegendo a célula urotelial em duas situações: reduzindo a formação de BCPN (metabólito ativo do BBN) e inibindo ação dos radicais livres na bexiga. Camundongos nocaute, para este fator de transcrição Nrf2, desenvolveram mais carcinomas de bexiga. Agentes quimiopreventivos, com efeito antioxidante, são capazes de induzir a fase II através

da ativação do Nrf2 e, dessa forma, proteger a célula do efeito do BCNP (IIDA et al., 2004; IIDA et al., 2007).

O efeito antioxidante *in vitro* não necessariamente implica proteção contra danos oxidativos *in vivo*. Pequena atividade antioxidante *in vitro* não significa que não resulte em efeito antioxidante *in vivo*. A quercetina e a catequina (flavonoides) podem interagir com a glutathione peroxidase, aumentando a sua atividade antioxidante. Somando-se a isso, a dose de polifenóis e flavonoides pode significar a diferença de um efeito antioxidante para um pró-oxidante, gerador de radicais livres, resultando em mutagênese (POOL-ZOBEL; BUB; SCHRÖDER, 1999; FERGUSON, 2001; SKIBOLA; SMITH, 2000; MURÍCIO, 2006).

A determinação da dose de 150mg/kg/peso da própolis para tratamento dos animais foi baseada na atividade antitumoral obtida por outros autores com o uso da WSDP, proveniente de Minas Gerais (ORSOLIC; BASIC, 2003).

Ratas foram escolhidas para este modelo por mimetizarem tumores superficiais de bexiga no homem. A decisão por fêmeas se deveu à necessidade de identificar as imagens de lesões tumorais intravesicais, e ratas são mais facilmente cateterizadas. Há relatos de que a testosterona influencia no aparecimento mais precoce de tumores de bexiga com o uso de BBN em camundongos, mas não em ratos. Existem outros carcinógenos de bexiga, como o N-hidroxy-N-2-fluorenilacetamida, em que o metabolismo em machos e fêmeas segue vias diferentes de ativação, resultando em diferenças na carcinogênese (BERTRAM; GRAIG, 1972; ITO et al., 1973).

A discussão sobre a avaliação dos efeitos biológicos no tratamento de animais submetidos à carcinogênese de bexiga pelo BBN tem início com a variação temporal da massa corporal. Esta variação é a massa corporal do tempo estudado em função da massa corporal verificada no início do estudo. A variação temporal da massa corporal (ΔMC), mensurada no grupo I, foi maior que a observada nos demais grupos em todos os tempos (6^a, 12^a, 18^a, 24^a, 30^a, 32^a, 36^a e 41^a semanas). Os animais do grupo I eram mais velhos uma semana que os demais grupos. O grupo I iniciou o tratamento com própolis com quatro semanas de idade e os demais grupos iniciaram o tratamento com seis semanas de

idade. Lembrando-se de que o grupo I começou recebendo própolis por 30 dias e foi receber BBN apenas uma semana após os demais grupos iniciarem o carcinógeno.

Na avaliação de peso do corpo, do fígado, do baço, no momento do óbito ou da eutanásia, não foram observadas diferenças entre os grupos; apenas o peso dos rins dos animais do grupo XIII foi diferente em relação ao peso dos rins de animais dos grupos II B ($P < 0,01$); X ($P < 0,01$); K ($P < 0,05$); L ($P < 0,05$) e N ($P < 0,001$). O grupo XIII recebeu apenas água intragástrica. O rim faz parte do sistema urinário, possui epitélio transicional em sua pelve e o rato possui refluxo vesicoureteral fisiológico. Estando a bexiga em contiguidade com o rim e sendo ela o alvo das tumorações, era de se esperar que alterações relacionadas ao rim fossem encontradas. Tumorações em parede vesical levam à estase de urina, dependendo de sua localização, e não apenas estase de urina como disfunção da anatomia da parede vesical e da fisiologia miccional, com déficit do esvaziamento vesical, levando à infecção urinária, litíase urinária, obstrução ureteral e ureterohidronefroze, complicações estas que foram observadas na maioria dos grupos, exceto nos grupos XI XII e XIII. Estas suspeitas poderiam explicar os resultados dos grupos que tiveram diferença significativa, porém os grupos XI e XII, que receberam própolis e *L*-lisina, não desenvolveram tumores intravesicais e o peso renal não foi diferente em relação aos outros grupos que desenvolveram tumores. Portanto, a hipótese formulada anteriormente demandaria estudo específico de cada tumoração, sua localização e dados, como infecção urinária e estudo histopatológico no diagnóstico de pielonefrite crônica e aguda em cada rim, o que é possível de ser realizado, pois se dispõe desse material, porém não é objetivo deste trabalho.

As bexigas não foram pesadas. No momento da eutanásia, elas foram insufladas com formol a 10% sem esvaziamento de seu conteúdo para não danificar as delicadas lesões em seu interior. Essa técnica de fixação possibilita identificação de cada lesão e mapeamento de cada uma delas. Na bexiga vazia, a parede se torna pregueada e, dessa forma, impede seu correto mapeamento. Somando-se a isso, a multiplicidade de lesões nas diversas fases da carcinogênese desencorajou a pesagem

da bexiga após a fixação. Como comparar pesos de bexiga contendo tumorações com características histopatológicas tão diferentes (hiperplasias, papilomas e carcinomas)? Sem falar da não existência de padrões entre tamanho e diagnóstico histopatológico das lesões, o peso poderia promover um viés de interpretação na comparação dos grupos.

A ultrassonografia foi realizada para que pudéssemos verificar o momento de aparecimento de lesões intravesicais e para determinar o início do tratamento nestes animais. Porém, devido à multiplicidade de imagens e multifocalidade das lesões em diferentes fases da carcinogênese, tornou-se o método inespecífico, embora bastante sensível. Na 40ª semana, apenas quatro animais sem imagem intravesical apresentavam lesões tumorais ao exame macroscópico; todas benignas na avaliação histopatológica. O transdutor de 10Mhz foi bastante sensível, detectando imagens de até 0,07cm de diâmetro (Grupo I - rato 7 - 31 a semana); no entanto, o exame poderia ser de maior ajuda na avaliação do tratamento de tumores de bexiga em ratos, em caso de implantes ortotópicos de carcinomas de bexiga, em que sabidamente qualquer crescimento tumoral equivaleria à imagem de um carcinoma.

Hoje, com o avanço de técnicas de imagem, passando dos transdutores de superfície à ressonância magnética e, mais recentemente, com transdutores endocavitários de fibras óticas com 40MHz, permitem-se estudos de implantes de carcinomas de células transitórias em ratos, com precisão para avaliação de invasão de mucosa, submucosa e muscular. Um minicistoscópio para cistoendoscopia em ratos foi criado e pode ajudar nas pesquisas de novas drogas contra o câncer de bexiga (CHIN et al., 1991; KADHIM et al., 1997; GOFRIT et al., 2006; SATOH et al., 2007; BOLENZ et al., 2007).

A análise de sobrevivência não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

O modelo de carcinoma de bexiga com o BBN nas doses de 0,05%, em água de beber, nas 14 semanas, resultou na incidência de carcinomas de 66,67% na 41ª semana. Esse resultado estava dentro do esperado para esse modelo, mas existe relato de incidência de 100% de carcinomas na 20ª semana em ratos que receberam BBN na mesma concentração de 0,05% por 20 semanas (GOFRIT et al., 2006).

O aspecto macroscópico das lesões intravesicais encontradas, sua distribuição multifocal com tumorações em diversas fases da carcinogênese, a neovascularização da parede vesical, a invasão e metástase, bem como a histopatologia de tumores foram semelhantes às descrições na literatura clássica (KUNZE; CHOWANIEC, 1990).

O carcinoma de células transicionais foi o tipo histológico mais incidente, com suas variantes de diferenciação escamosa, glandular, escamosa/glandular e pseudoglandular. Apenas um caso de CCT com diferenciação oxifilica foi encontrado sem descrição na literatura. Tratava-se de um CCT com três padrões de diferenciação: glandular mucinosa (presença de células em anel de sinete), oxifilica e escamosa. Esse tumor foi observado em um rato do grupo X. Os outros subtipos foram tumores mistos: CCT com escamoso e CCT com escamoso/adeno carcinoma. O carcinoma escamoso puro foi identificado apenas em quatro bexigas. Adenocarcinomas puros não foram encontrados. Não foi realizada análise estatística para comparação dos subtipos histopatológicos entre os grupos devido ao pequeno número de tumores dos grupos I, IIA e IIB.

Carcinomas de células transicionais de pelve renal são incomuns no modelo de BBN em ratos Wistar. Neste estudo, foram identificados três ratos com carcinoma de células transicionais em pelve renal: dois animais pertenciam ao grupo III e um animal pertencia ao grupo X. Esse animal do grupo X também apresentava CCT em todo o ureter. Os três animais foram excluídos do estudo. Outros três animais do grupo III apresentavam papilomas na pelve renal. Pode ser que haja alguma relação entre esses achados e *L*-lisina presente na própolis no tratamento de carcinomas de bexiga dos grupos III e X.

O menor índice de carcinogênese de carcinomas em animais do grupo I (que recebeu própolis 30 dias antes do BBN), em relação ao índice de carcinogênese do grupo controle que recebeu apenas carcinógeno, validando o IC, a incidência de carcinomas e, no grupo I, foi menor estatisticamente significativa que a incidência de carcinomas do grupo III, que recebeu própolis por 40 semanas, sem a prévia administração de própolis ao carcinógeno (DORNELAS, et al., 2012a). Isso significa que a própolis extraída em *L*-lisina tem efeito quimiopreventivo na carcino-

gênese vesical, quando administrada crônica e previamente ao BBN. A quimioprevenção refere-se à prevenção de formação de tumor pela administração de compostos naturais ou sintéticos não tóxicos que podem bloquear ou atenuar a influência de carcinógenos em alvos celulares ou ainda reverter lesões (SZUMILO, 2009). Os achados se assemelham aos observados na redução da incidência de tumores em camundongos submetidos à carcinogênese de pele, bem como de pulmão, quando tratados com a própolis brasileira (MITAMURA et al., 1996; KIMOTO et al., 2001; SUGIMOTO et al., 2003).

Artepillin C sintetizado e extrato alcoólico de própolis verde contendo artepillin C reduziram a carcinogênese de pulmão em camundongos, porém, naqueles experimentos, a redução de incidência foi concomitante ao uso de carcinógeno Fe-NTA (KIMOTO et al., 2001).

A própolis liofilizada do presente estudo não continha artepillin C, apenas um de seus derivados. Isso significa que também outros compostos foram responsáveis pela inibição da carcinogênese no grupo I (SIMÕES et al., 2004; MAURÍCIO, 2006).

O estresse oxidativo faz parte da fisiopatologia da carcinogênese não apenas na iniciação, mas na progressão do câncer. Pode ser que a atividade antioxidante tenha algum papel na quimioprevenção observada no grupo I. Dos compostos presentes na própolis liofilizada, dois têm ação antioxidante importante: o p-cumárico e o ácido cafeico. Importante lembrar que o composto p-cumárico está presente em maior quantidade que os demais compostos da própolis liofilizada. Em que porcentagem estaria então ele contribuindo para estes resultados?

É clássico o conhecimento da importância do sistema imunológico no desenvolvimento das neoplasias. O perfil imunológico do hospedeiro pode ditar a evolução do câncer.

A própolis tem influenciado ora estimulando, ora suprimindo eventos imunológicos (FISCHER et al., 2008).

O efeito potencializador imunológico foi evocado quando a própolis brasileira injetada no subcutâneo de camundongos reduziu o crescimento de tumor de Erlich, porém sem resposta pela via oral. Mas a própolis administrada por via oral, quando foi associada ao 5 FU reduziu o tumor com melhora da citopenia induzida pelo quimioterápico

(SUZUKI et al., 2002). Entretanto, na comparação dos índices de carcinogênese de animais que receberam a administração subcutânea de própolis (IIA) e água (IIB) e seu respectivo controle, não houve diferença estatisticamente significativa [validando o IC, também a incidência de tumores em ratos tratados com própolis subcutâneo (Grupo IIA), no presente estudo, não foi significativa em relação ao seu respectivo controle] (DORNELAS, et al., 2012a).

A ação imunomoduladora de WSDP da própolis de Sofia, na Bulgária, foi investigada através da dosagem de atividade residual de Complemento C3, em ensaio de inibição do complemento. O WSDP inibiu as vias clássica e alternativa, provocando uma diminuição da atividade funcional de C3 (IVANOVSKA et al., 1995).

A quimioprevenção foi obtida contra metástases pulmonares em camundongos inoculados com carcinoma mamário espontâneo de camundongos, em veia lateral da cauda, com WSDP tanto do Brasil (MG) quanto da Croácia, nas doses de 50 e 150mg/kg/peso intraperitoneal, 15, 10, 5 dias antes da inoculação e 2, 7, 12 dias após a inoculação. Ensaio avaliando eventos imunológicos como: a produção de linfócitos, a ativação e a eficácia de macrófagos em induzir apoptose de células tumorais *in vitro*, respostas mitogênicas de linfócitos, peso e celularidade de baço, correlacionados com propriedades antimetastáticas, foram sugestivos no sentido de que essas propriedades estão ligadas a um aumento não específico da resistência antitumoral em camundongos pela ativação de macrófagos (ORSOLIC; BASIC, 2003). Em um experimento sequencial, o mesmo grupo de pesquisadores, administrando o WSDP tanto do Brasil (MG) quanto da Croácia, bem como compostos polifenólicos, entre eles o ácido cafeico, nas doses de 50mg/kg/peso, via oral, por sete dias, iniciado duas horas antes da inoculação de 2.106 células de tumor de Erlich, após 14 dias, obteve inibição do crescimento e da proliferação do tumor com aumento da atividade de macrófagos intraperitoneais (ORSOLIC; BASIC, 2005). Ainda em sequência, repetindo o estudo e administrando, via oral e intraperitoneal, nas mesmas dosagens de WSDP croata e brasileiro e polifenólicos, entre os quais o ácido cafeico, contra o mesmo tumor, observou-se uma melhora na sobrevivência dos animais e importante estímulo de macrófagos. Enfatizou-se que

também a via de administração da própolis influencia no crescimento tumoral, e que a via oral, a preferida para avaliação em experimentos, foi tão efetiva quanto a via intraperitoneal. Observou-se ainda que o produto da própolis WSDP foi terapeuticamente mais efetivo que os compostos administrados individualmente, mostrando que a própolis possui compostos que podem ter efeitos antitumorais sinérgicos (ORSOLIC; KOSALEC; BASIC, 2005).

Outros estudiosos da própolis caminharam nesta esteira de avaliação da quimioprevenção da própolis WSDP e extrato etanólico de própolis da Croácia, administrando a dose de 100mg/kg/peso intraperitoneal, três dias antes da inoculação de 10^6 células de tumor de Erlich intraperitoneal em camundongos. Um quimioterápico foi administrado intraperitonealmente nos dias 1, 13 e 19 após a inoculação tumoral. Ocorreu um sinergismo na associação com o quimioterápico, com regressão do tumor e aumento da sobrevida, mas a própolis WSDP e o extrato isolados não aumentaram a sobrevida dos animais (BENKOVIC et al., 2007).

Pesquisadores brasileiros recentemente classificaram a própolis como um adjuvante não particulado o qual é aquele que não necessita de partícula e se beneficia da associação de um adjuvante particulado. Na realidade não se combinam com o antígeno, traduzindo em resposta humoral ineficiente. No entanto, quando associado a um adjuvante particulado, eles são enviados às células apresentadoras de antígenos, prolongando a exposição antigênica às células do sistema imune, amplificando esta resposta (LINDBLAND, 2004; FISCHER et al., 2008). Foi baseado nesses conceitos que esses pesquisadores estabeleceram esta classificação para a própolis, quando avaliaram camundongos vacinados com vacina Herpes I, que receberam extrato etanólico de própolis e hidróxido de alumínio. Eles observaram um maior nível de anticorpos do que aqueles que receberam apenas própolis e a vacina. No entanto, os animais não beneficiados pela resposta humoral tiveram uma resposta celular aumentada, evidenciada pelo aumento da expressão de mRNA de Interferon gama ($IFN\gamma$) (FISCHER et al., 2007; FISCHER et al., 2008).

Os efeitos, aparentemente contraditórios do produto da própolis ora como inibidora, ora como estimuladora dos eventos imunológicos,

podem ser explicados pela diversidade de compostos que constitui sua complexidade química ainda pouco estudada, bem como os diversos métodos de extração existentes (FISCHER et al., 2008).

Não apenas a própolis do Brasil, como se viu, mas a de outros países, atualmente são estudadas paralelamente aos compostos de interesse farmacológico, visando ao esclarecimento desses efeitos contraditórios (DORNELAS, et al., 2012a). Os compostos isolados mais comuns e alguns deles sintetizados são o artepillin C, o CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), ácido p-cumárico, ácido cafeico, quercetin, entre outros, com redução de tumores em animais (ORSOLIC et al., 2004.; ORSOLIC; KOSALEK; BASIC, 2005; ORSOLIC; TERZIC; MIHALJEVIC, 2005; ORSOLIC, BASIC, 2005), e efeitos citotóxicos em cultura de células de carcinomas humanos, como carcinoma de células transicionais de bexiga, câncer pancreático, carcinoma epidermoide de laringe (BÚFALO; CANDEIAS; SFORCIN, 2007; AWALE; LI et al., 2008; ORSOLIC; STAJCAR; BASIC, 2009).

O índice de carcinogênese do grupo I (que recebeu própolis 30 dias antes do BBN) foi menor (estatisticamente significante) em relação ao índice de carcinogênese do grupo III, que recebeu própolis por 40 semanas, sem a prévia administração de própolis ao carcinógeno [Validando o IC, também a incidência de carcinomas no grupo I foi menor estatisticamente significante que a incidência de carcinomas do grupo III (DORNELAS et al., 2012a)]. Ou seja, também ocorreu uma melhor *performance* de proteção da própolis no grupo de animais que foram tratados previamente com própolis. Apesar disso, não houve diferença entre o grupo III e o grupo K controle no qual foi administrado apenas carcinógeno.

O índice de carcinogênese (tais como a incidência, histopatologia, multiplicidade, invasão, atipia, diferenciação e classificação nos subtipos) não revelou eficiência significante da própolis na redução da carcinogênese quando iniciada concomitante com o carcinógeno nas duas vias administradas (também validando o Índice de Carcinogênese). Esses resultados podem estar ligados ao método de extração WSDP, que se mostrou ineficiente para a extração de compostos ativos. A L-lisina pode também ter contribuído para estes resultados, como será discutido a seguir.

Os animais que foram tratados com *L*-lisina (Grupo X) apresentaram maior índice de carcinogênese do que aqueles que receberam apenas carcinógeno (grupo K) [validando o IC com a multiplicidade de carcinomas, o grupo X apresentou maior multiplicidade de carcinomas que o grupo K (controle) e, ainda mais, validando o IC com o parâmetro invasão: os animais tratados com *L*-lisina (Grupo X) apresentaram tumores mais invasivos, atingindo o peritônio e com metástases peritoniais em relação ao grupo controle (Grupo K), ou seja, a proporção de tumores com grau de invasão de serosa e metástase peritoneal foi maior no grupo X (DORNELAS, et al., 2012a)].

Era de se esperar que em um modelo para carcinogênese de bexiga existisse a preocupação com a criação de um grupo controle com a *L*-lisina, já que três aminoácidos são descritos como promotores da carcinogênese da bexiga, entre eles *DL* triptofano, *L*-leucina, *L*-isoleucina (ITO et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2006). Este conhecimento e o fato de se utilizar um aminoácido para extração da própolis (WSDP) foram determinantes para a constituição dos grupos com a *L*-lisina para que se pudessem observar os efeitos desta na carcinogênese.

O maior índice de carcinogênese no grupo X que recebeu BBN e *L*-lisina, quando comparados com o grupo controle (grupo K), [validando o IC com maior multiplicidade de carcinomas e maior invasão tumoral em animais que foram tratados com *L*-lisina e receberam BBN (DORNELAS et al, 2012)], traduz que existe um estímulo da *L*-lisina na carcinogênese vesical. Lembrar que o grupo que recebeu apenas *L*-lisina não apresentou lesões vesicais, ou seja, a *L*-lisina nas doses e modelo utilizados não foi capaz de iniciar e promover a carcinogênese por si só. Isso sugere que a *L*-lisina é um aminoácido promotor de carcinogênese vesical em ratos nas doses e tempo utilizados neste experimento. Esses achados contradizem os primeiros experimentos de investigação de promoção de carcinogênese de bexiga *in vitro*. Pesquisadores, utilizando células de bexiga extraídas de ratos tratados com carcinógenos, observaram aumento de aglutinação com a concavalin A, em presença de promotor de carcinogênese de bexiga. Este ensaio foi então utilizado para avaliação de 21 aminoácidos (KAKIZOE et al., 1982). Apenas a *L*-isoleucina, *L*-leucina e *L*-valina e *DL*- triptofano apresen-

taram aglutinação significativa estatisticamente. A *L*-lisina aglutinou poucas células iniciadas. Estudos *in vivo* comprovaram estes resultados referentes à *L*-leucina e *L*-isoleucina, bem como *DL*-triptofano (COHEN et al., 1979; NISHIO et al., 1986; ITO et al., 1989; OLIVEIRA et al., 2006). Não foram encontradas referências de efeito promotor da *L*-lisina na carcinogênese de bexiga (DORNELAS, et al., 2012a).

A *L*-lisina é um aminoácido estritamente essencial. Não é sintetizado pelo corpo humano, nem pelos animais, por isso é preconizada internacionalmente uma quantidade de pelo menos 1,3% de *L*-lisina em rações balanceadas.

A *L*-lisina é importante para a síntese de colágeno, fundamental para o crescimento dos tecidos e sua reparação, bem como para a produção de anticorpos, hormônios e enzimas. No homem, é absorvida no intestino delgado, nos enterócitos, através de transporte ativo, e se dirige ao fígado, via sistema porta. Uma vez no fígado, junta-se a outros aminoácidos na síntese de proteínas. A *L*-lisina é convertida em Acetil Co A, componente do metabolismo dos carboidratos na produção de energia. A *L*-lisina também é precursora de aminoácido carnitina, que ajuda no transporte de ácidos graxos de cadeia longa ao interior da mitocôndria para produção de energia. Estudos clínicos sugerem que a *L*-lisina pode ser útil em diminuir as recorrências de pacientes infectados com herpesvírus. Ela parece ter uma relação antagônica com o aminoácido arginina (necessário para a replicação do herpesvírus). Neste caso específico, parece haver uma competição com a arginina na absorção intestinal, reabsorção nos túbulos renais e transporte, através de membrana basal, para o interior das células. Existem relatos do uso em osteoporose, com uma possível facilitação da *L*-lisina na absorção do cálcio e diminuição da excreção de cálcio pelos rins. Linus Pauling publicou casos de pacientes coronariopatas graves, comprovados laboratorialmente, que, curiosamente, tiveram melhora de sintomas de angina pectoris, após ingestão de altas doses de *L*-lisina por tempo prolongado. Nestas publicações, o autor levanta a hipótese de que o aminoácido pode se ligar e remover lipoproteínas da placa aterosclerótica, reduzindo o espessamento da parede e melhorando o fluxo vascular, ou ainda produ-

zindo vasodilatação (PAULING, 1991; MCBEATH; PAULING, 1993; PAULING, 1993; *L-LYSINE*, 2007).

Existem fortes evidências de que a atividade e expressão de COX 2 é importante no desenvolvimento do câncer de bexiga superficial no homem, e os níveis de COX 2 estão relacionados positivamente com a invasão do CCT. A expressão de COX 2 em carcinomas de bexiga em ratos e cães estava elevada em alguns relatos. O aumento da expressão de COX 2 está relacionado com invasão e metástase. A COX 2 induz fatores de crescimento, como VEGF, óxido nítrico sintetase, interleucina 6 e 8 e TIE2, e produz prostaglandinas, que têm efeitos na proliferação e migração da célula endotelial *in vitro*. A COX 2 é super-expressa em células endoteliais. Existe uma associação da COX 2 com vascularização tumoral, densidade microvascular e VEGF. O celecoxibe é um inibidor seletivo da COX 2 e tem se mostrado capaz de inibir fatores de crescimento de córneas e reduzir o crescimento e a incidência de tumores de bexiga em ratos (GRUBBS et al., 2000; MAZHAR; GILMORE; WAXMAN, 2005; KLEIN et al., 2005). Entretanto, em nosso trabalho, o objetivo do celecoxibe, apesar de ser avaliado em todos os parâmetros, não foi para avaliação de inibição de carcinogênese, e sim de angiogênese (DORNELAS, et al., 2012b).

Ensaios paralelos foram realizados com sangue (linfócitos - Teste do Cometa) e aspirado de medula óssea de fêmur (Teste do Micronúcleo), coletados no momento da eutanásia, para avaliação de genotoxicidade em todos os animais de todos os grupos e os resultados mostraram que tanto a própolis quanto a *L*-lisina nas doses de 150mg/kg peso, por 40 semanas, não são genotóxicas para a medula óssea nem para linfócitos de sangue periférico (DORNELAS et al., 2014). Os resultados sugerem que tanto a própolis como a *L*-lisina são eficientes na proteção da genotoxicidade da medula óssea e linfócitos de sangue periférico, quando comparados todos os grupos que ingeriram carcinógenos com os grupos controles K e IIB que receberam BBN e água oral e subcutânea, respectivamente (DORNELAS et al., 2014). Estes testes normalmente são utilizados para avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A validação do método de escore surgiu quando se comparou os resultados estatísticos do Índice de Carcinogênese com os parâmetros: Incidência, Multiplicidade e Grau de Invasão. Desta forma, o Índice de Carcinogênese passa a ser mais um recurso, uma ferramenta que poderá ser utilizada para estudo da carcinogênese de bexiga em modelos experimentais.

Ficou constatado então que apenas avaliando o Índice de Carcinogênese, ele pode perfeitamente substituir os demais parâmetros clássicos, sem que fiquem prejudicados os resultados dos experimentos.

Os resultados obtidos claramente evidenciaram que o produto da própolis verde extraída em *L*-lisina inibe a carcinogênese quando administrado previamente ao carcinógeno, conforme demonstrado no Índice de Carcinogênese. Também ficou provado estatisticamente a ação da *L*-lisina como promotora da carcinogênese de bexiga expressos no Índice de Carcinogênese.

Pesquisar os mecanismos de ação de cada composto contido na própolis torna-se relevante à medida que seus efeitos e ações são constatados *in vitro* e *in vivo*, tornando-os, dessa forma, aliados no combate ao câncer. A própolis tem sido produzida pelas abelhas para sua proteção há milhares de anos. Pode ser que esteja nela a resposta para o tratamento de muitas doenças e, quem sabe, no futuro, a ciência possa se curvar diante delas: *As abelhas, farmacêuticas com asas* (Título do livro de IOIRICH, 1981).

REFERÊNCIAS

- AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.* v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
- AHN, M. et al. Suppression of tumor – induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endotelial cell proliferation. *Can.Let.*, v. 252, p. 235-243, 2007.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Eth. Pharm.*, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALENCAR, S. M. et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica da própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ALLINEN, M. et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.*, v. 6, p. 17-32, 2004.
- AMOROS, M. et al. vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, v. 23, p. 231-240, 1992.
- AWALE, S. et al Constituents of brazilian red propolis and their pre-frential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Biorg. Med. Chem.*, v. 16, p. 181-189, 2008.
- BANCOVA, V. Chemical diversity of propolis and problem of standardization. *J. Eth. Pharm.*, v. 100, p. 114-117, 2005.

BANCOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.

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

BANSKOTA, A. H. et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001.

BANSKOTA, A. H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J. Eth. Pharm.*, v. 80, p. 67-73, 2002.

BARROS, M. P. et al. Effect of brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Eth. Pharm.*, v. 110, p. 567-571, 2007.

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

BENKOVIC, V. et al. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: alkaline comet assay study. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 31, n. 1, p. 167-172, 2008.

BERGERS, G.; BENJAMIM, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews*, v. 3, p. 401-410, 2003.

BERTRAM, J. S.; GRAIG, A. W. Specific induction of bladder cancer in mice by butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and the effects of hormonal modifications on the sex difference in response. *Eur. J. cancer*, v. 8, n. 6, p. 587-594, 1972.

BIANCHINI, L.; BEBENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci. Agric.*, v. 55, n. 1, 1998.

BLONSKA, M. et al. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J. Eth. Pharm.*, v. 91, p. 25-30, 2004.

BOLENZ, C. et al. Newly developed mini-endoscope for diagnosis and follow-up of orthotopic bladder transitional-cell carcinoma in vivo. *J. Endourol.*, v. 21, n. 7, p. 789-794, 2007.

BORRELI, F. et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, v. 73, p. 38-43, 2002.

BRYAN, G. T.; COHEN, S. M. *The pathology of bladder cancer*. Boca Raton: CRC Pres Inc, 1984.

BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M. G.; SFORCIN, M. *In vitro* cytotoxic effect of brazilian Green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *e-CAM*, v. 6, n. 4, 2007.

CALÓ, V. et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.*, v. 197, p. 157-168, 2003.

CARDILE, V. et al. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sci.*, v. 73, p. 1027-1035, 2003.

CASTEGNARO, M. et al. Laboratory descontamination and destruction of carcinogens in laboratory waste: some N- nitrosamines. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, n. 43, p. 23-26, 1982.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

CHIN, J. et al. Magnetic resonance imaging for detecting and treatment monitoring of orthotopic murine bladder tumor implants. *J. Urol.*, v. 145, n. 6, p. 1297-1301, 1991.

CLARK, S. J.; Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, v. 16, p. R88-R95, 2007.

COHEN, S. M. Role of urinary physiology and chemistry in bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.*, v. 33, n. 9, p. 715-730, 1995.

COHEN, S. M. et al. Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinay bladder carcinogenesis. *Cancer. Res.*, v. 39, p. 1207-1217, 1979.

COLLER, H. A.; FORMAN, J. J.; LEGESSE-MILLER, A. Myc Ed Messages: Myc induces transcriptions of E2F1 while inhibiting its translation via microRNA polycistron. *PloS Genet.*, v. 3, n. 8, p. 1319-1324, 2007.

COLLER, M. H.; ESTELLER, M. Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications, *Cell Cycle*, v. 4, n. 10, p. 1377-1381, 2005.

DANTAS, A. P. et al. Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J. Eth. Pharm.*, v. 103, p. 187-193, 2006.

DAUGSCH, A. et al. Própolis vermelha e sua origem botânica. *APACAME- Mensagem Doce*, v. 89, 2006. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>>. Acesso em: 4 jan. 2008.

DeSESSO, J. M. Anatomical relationships of urinary bladders compared: their potential role in the development of bladder tumours in humans and rats. *Fd Chem. Toxicol.*, v. 33, n. 9, p. 705-714, 1995.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, v. 22, p. 155-162, 1991.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine*, v. 10, n. 12, 1992, p. 817-823, 1992.

DORNELAS, C. A. et al. Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. *Acta Cir Bras.* v. 162, n. 27, p. 185-192, 2012a.

DORNELAS, C. A. et al. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. *Acta Cir Bras.* Aug; v. 27, n. 8, p. 529-536, 2012b.

DORNELAS, C. A. et al. Potential Chemoprotective effects of green propolis, *l*-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis *Acta Cir Bras.* v. 29, n. 7, p. 423-428, 2014.

DVORAK, H. F. How tumors make bad blood vessel and stroma. *AJP*, v. 162, n. 6, p. 1747-1755, 2003.

EL-KATIB, A. S. et al. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. *Z. Naturforsch.* v. 57c, p. 379-385, 2002.

EPSTEIN, J. I. O trato urinário inferior e o sistema genital masculino. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. *Robbins e Cotran*, patologia - as bases patológicas das doenças. Robbins e Coltran. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1067-1079.

EPSTEIN, J. I. et al. The bladder consensus conference committee. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 22, p. 1435-1448, 1998.

EROGLU, H. E.; TATLISEN, A. OZKUL, YU. Effects of propolis and Mitomycin-C on micronucleous in tissue cultures of bladder cancer. *E. U. J. of Health Sciences.* v. 13, n. 2, p. 15-20, 2004.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.*, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, v. 25, p. 1250-1256, 2007.

FLANAGAN, J. M. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *Br. J. Cancer*, v. 96, p. 183-188, 2007.

FUKUSHIMA, S. Modification of tumor development in the urinary bladder. *Prog. Exp. Tumor. Res.*, v. 33, p. 154-174, 1991.

FUKUSHIMA, S. et al. Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann*, v. 67, n. 1, p. 81-90, 1976.

FUKUSHIMA, S.; WANIBUCHI, H. Prevention of urinary bladder cancer: the interface between experimental and human studies. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.*, v.1, p.15-33, 2000.

FULIANG, H. U. effects of propolis on blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol. Res.*, v. 51, p. 147-152, 2005.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharisdracunculifolia* DC (compositae) and its effects on mouse fibroblast. *J. Eth. Pharm.*, v. 111, p. 206-212, 2007.

GANGOLLI, S. D. A method for the destruction of nitrosamines solution. *Food Cosmet. Toxicol.*, p. 168, 1974.

GEKKER, G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J. Eth. Pharm.*, v. 102, p. 158-163, 2005.

GOFRIT, O. N. et al. Chemically induced bladder cancer: A sonographic and morphologic description. *Urology*, v. 68, n. 1, p. 231-235, 2006.

GOLIJANIN, D. J. et al. Chemoprevention of bladder cancer. *Worl. J. Urol.*, v. 24, p. 445- 472, 2006.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue) *J.R.S.M.*, v. 83, 1990.

GRUBBS, C. J. et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *Cancer Res.*, v. 60, n. 20, p. 5599-5602, 2000.

HAGIWARA, A. et al. Hepatocarcinogenic activity of n-butyl-n(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, v. 19, p. 33- 42, 1999.

HASHIMOTO, Y.; SUZUKI, K.; OKADA, M. Induction of urinary bladder tumors in aci/n rats by butyl(3-carboxypropyl)nitrosoamine, a major urinary metabolite of butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann*, p. 637-638, 1972.

HASHIMOTO, Y.; SUZUKI, K.; OKADA, M. Induction of urinary bladder tumors by intravesicular instillation of butyl(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gann*, v. 65, p. 69-73, 1974.

HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA H. S. In vitro neoplastic transformation of epithelial cells of rat urinary bladder by nitrosamines. *Nature*, v. 252, p. 497-499, 1974.

HAYACIBARA, M. F. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J. Eth. Pharm.*, v. 101, p. 110-115, 2005.

HEGAZI, A. G.; HADY, F. K. A. Egyptian propolis 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch*, v. 57c, p. 395-402, 2002.

HEPSEN, I. F.; ER, H.; ÇEKİÇ, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res.*, v. 31, p. 426-431, 1999.

HERNANDES, J. et al. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.*, v. 73, p. 1469-1474, 2007.

HIROSE, M. et al. Different susceptibilities of the urinary bladder epithelium of animal species to three nitroso compounds. *Gann*, v. 67, p. 175-189, 1976.

HIROSE, M. et al. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 1, p. 207-212, 1997.

HSIAO, G. et al. Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cardiovas. Res.*, v. 76, p. 782-792, 2007.

HU, M.; POLYAK, K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 18, n. 1, p. 27-34, 2008.

HUANG, M. T. 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*, v. 17, n. 4, p. 761-765, 1996.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an Aqueous extract of propolis. *IMAJ*, v. 4, p. 923-927, 2002.

IIDA, K. et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 64, p. 6424-6431, 2004.

IIDA, K. et al. Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 28, p. 2398-2403, 2007.

INOKUCHI, Y. et al. Brazilian green propolis protect against retinal damage in vitro and in vivo. *eCAM*, v. 3, n. 1, p. 71-7, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer – Consolidado. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR> Acesso em: 3 abr 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Bladder Cancer. Disponível em <<http://eco.iarc.fr/EUCAN/Cancer.aspx?Cancer=32>>. Acesso em: 2 abr. 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Handling chemical carcinogens in the laboratory problems of safety. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, v. 33, p. 1-33, 1979.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. International Classification of rodent tumours. Part I: The rat. 3- urinary system. *IARC Sci. Publ.*, v. 122, p. 1-46, 1992.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory waste: some N- nitrosamines. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, n. 43, p. 1-73, 1982.

IOIRICH, N. *As abelhas, farmacêuticas com asas*. Moscou: Mir Moscovo, 1981.

ISLA, M. I. et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J. Eth. Pharm.*, v. 76, p. 165-170. 2001.

ITO, N. Early changes caused by N- butyl-N- (4-hydroxybutyl) nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. *Cancer Res.*, v. 36, p. 2528-2531, 1976.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S. Promotion of urinary bladder carcinogenesis in experimental animals. *Exp. Pathol.*, v. 36, p. 1-15, 1989.

ITO, N. et al. Histogenesis of urinary bladder tumor induced by N-butyl-N-(4-hidroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gann*, v. 60, p. 402-410, 1969.

ITO, N. et al. Effect of various factors on induction of urinary bladder tumors in animals by N-butyl-N- (4-hidroxybutyl) nitrosamine. *Gann*, v. 64, p. 151-159, 1973.

IVANOVSKA, N. D. Et al. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *J. Eth. Pharm.*, v. 47, p. 135-143, 1995.

JASPRICA, I. et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. Eth. Pharm.*, v. 110, p. 548-554, 2007.

JENG, S. N. et al. *Food Chem. Toxicol.*, v. 38, p. 893-897, 2000.

JONES, T. D. et al. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin. Cancer. Res.* v. 11, p. 6512-6519, 2005.

JUNG, J. E. et al. Caffeic acid and its syntetic derivative CADAPE, suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, v. 8, p. 1780-1787, 2007.

KADHIM, S. A. et al. Genetically regulated response to intravesical bacillus Calmette Guerin immunotherapy of orthotopic murine bladder tumor. *J. Urol.*, v. 158, n. 2 p. 646-652, 1997.

KAKIZOE, T. Detection of amino acids as possible promoters of bladder cancer in rats by measuring their enhacement of agglutination of bladder cells by concavalin A. *Gann*, v. 73, p. 870-873, 1982.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanism of angiogenesis. *Biochemistry*, Moscou, v. 73, p. 751-762, 2008.

KARTICIOGLU, H.; MERCAN, N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 1, n. 11, p. 1151-1153, 2006.

KAWANISHI, H. et al. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. *British J. Cancer.*, v. 97, n. 2, p. 260-266, 2007.

KIMOTO, T. et al. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitriolotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows Arch.*, v. 438, p. 259-270, 2001.

KLEIN, R. D. et al. Transitional cell hyperplasia and carcinomas in urinary bladder of transgenic mice with keratin 5 promoter-driven cyclooxygenase-2 overexpression. *Cancer Res.*, v. 65, n. 5, 2005.

KNOWLES, M. A. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, v. 27, p. 361-373, 2006.

KONISHI, S.; CHRISTINE, A.; SAWAYA, H. F.; Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Mensagem Doce*, v. 75. 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/75/artigo.htm>>. Acesso em: 4 jan. 2008.

KRELL, R. *Value-added products from beekeeping*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996. Disponível em: <http://www.apiterapia.biz/pliki/value_added_products.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2008.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Eth. Pharm.*, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.*, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUNIMASA, K. et al. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation

of survival signal ERK $\frac{1}{2}$. *eCAM*. 2011. Disponível em :<<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/870753/>>. Acesso em: 30 fev. 2012.

KUNZE, E.; CHOWANIEC, J. Tumor of the urinary bladder in: Pathology of tumours in laboratory animais. *IARC Sci. Publ.*, Lyon, n. 99, p. 345-397, 1990.

KUNZE, E.; SCHAUER, A. Morphology, classification and histogenesis of n-butyl-n-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced carcinomas in the urinary bladder of rats *Z. Naturforsch.*, v. 88, p. 273-289, 1977.

KUNZE, K.; SCHAUER, A.; SCHAT, S. Stages of transformation in the development of N-butyl-N(4- hydroxybutyl)-nitrosamine-induced transitional cell carcinomas in the urinary bladder of rats. *Z. Naturforsch.*, v. 87, p. 139-160, 1976.

L-LYSINE...*Altern. Med. Rev.*, v. 12, n. 2, 2007.

LAIRD, P. W. Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.*, v. 14, p. R65 - R76, 2005.

LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano in vitro de própolis. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 48, n. 2, p. 227-229, 1996.

LEE, Y. J. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Bio. Chem. Pharm.*, v. 66, p. 2282-2289, 2003.

LEEMAN-NEILL, R. J. Prevention and treatment of head and neck cancer with natural compound inhibitors of STAT3. Tese (doutorado em Filosofia) - Departamento de patologia, Universidade de Pittsburgh, Pittsburgh, 2008.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants in retrospect and prospect. *Vaccine*, v. 22, n. 27-28, p. 3658-3668, 2004.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of brazilian and Bulgarian propolis against different species of leishmania. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2007.

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 19, n. 5, 1996.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from brazilian própolis with pharmacological activities. *J. Eth. Pharmac.*, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C. et al. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Revista Fitos*, v. 1, n. 3, 2006.

MAURÍCIO A. Q. *Estudo da atividade antioxidante do ácido cafeico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético*. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MAZHAR, D.; GILLMORE, R.; WAXMAN, J. COX and cancer. *QJM*, v. 98, n. 10, p. 711-718, 2005.

MCBEATH, M.; PAULING, L. A case history: lysine/ascorbate-related amelioration of angina pectoris. *J. Orthomolecular Med.*, v. 8, p.77-78, 1993.

MELLIU, E.; STRATIS, E.; CHINO, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chem.*, v. 103, p. 375-380, 2007.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedade farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MESSING, E. M. Urothelial tumors of bladder In: *Walsh C. Campbell's urology*. 9. ed. Philadelphia: Saunders, p. 2407-2446, 2007.

MISHIMA, S. et al. Antihypertensive effects of brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 10, p. 1909-1914, 2005.

MISHIMA, S. et al. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *J. Eth. Pharm.*, v. 99, p. 5-11, 2005.

MITAMURA, T. et al. Effect of a new clerodanedi-pertenoid isolated from propolis on chemical induced skin tumors in mice. *Anticancer Res.*, v. 16, p. 2669-2672, 1996.

MO, L. et al. Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis *J. Clin. Invest.*, v. 117, n. 2, p. 314-325, 2007.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem.*, v. 103, p. 1097-1103, 2007.

MORENO, M. I. N. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Eth. Pharm.*, v. 71, p. 109-114. 2000.

MURAD, J. M. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Eth. Pharm.*, v. 79, p. 331-334, 2002.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem.*, v. 80, p. 29-93, 2003.

NAGAOKA, T. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, n. 4. p. 487-491, 2003.

NAGASAWA, H. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. *Anticancer Res.*, v. 16, n. 5, p. 2669-2672, 1996.

NAKAJIMA, Y. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Scie.*, v. 80, p. 370-377, 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Bladder Cancer*. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/bladder/HealthProfessional>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Estimated new cases and deaths from bladder cancer in the United States in 2009*. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/bladder>>. Acesso em: 15 maio, 2009.

NICOLOV, N. et al. *Method for the preparation of water-soluble derivative of propolis*. Patente n. 79903. Sofia. Bulgária. 1987.

NISHIO, Y. et al. *L- isoleucine e L- leucine: tumor promoter of bladder cancer in rats*. *Science*, v. 231, p. 843-845, 1986.

OGETURK, M. et al. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J. Eth. Pharm.*, v. 97, p. 273-280, 2005.

OHNO, H. Effects of testosterone on cell proliferation and apoptosis in BBN- induced mouse urinary bladder carcinogenesis. *YonagoActa Med.*, v. 43, p. 121-130, 2000.

OHTANI, M. et al. Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N- butyl -N- (4- hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Res.*, v. 46, p. 2001-2004, 1986.

OKADA, M.; HASHIMOTO, Y. Carcinogenic effect of nitrosoamines related to butyl(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats, with special reference to induction of urinary bladder tumors. *Gann*, v. 65, p. 13-19, 1974.

OKUTAN, H. et al. Effects of caffeic acid phenethyl Ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin. Biochem.*, v. 38, p. 191-196, 2005.

OLIVEIRA, M. L. S. *Efeito de baixas doses da samambaia Pteridium aquilinum sobre a carcinogênese induzida por N-butil-N-(4-Hidroxibutil) nitrosamina e uracil na bexiga urinária do rato*. 1993. (Mestrado em patologia) - Faculdade de medicina de Botucatu, Botucatu, 1993.

OLIVEIRA, P. A. et al. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp. Oncol.*, v. 28, p. 2-11, 2006.

OLIVEIRA, T. T. et al. de antocianina e própolis em diabetes induzida em coelhos. *Medicina*, v. 35, p. 464- 469, 2002.

ORSI, R. O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins.*, v. 2, n. 2, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of própolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Eth. Pharm.*, v. 84, p. 265-273, 2003.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J. Eth. Pharm.*, v. 102, p. 37-45, 2005.

ORSOLIC, N. et al. Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 30, n. 5, p. 946-951, 2007.

ORSOLIC, N. et al. Effect of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, 2005.

ORSOLIC, N. et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Eth. Pharm.*, v. 94, p. 307-315, 2004.

ORSOLIC, N.; KOSALEK, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 28, n. 4, p. 694-700, 2005.

ORSOLIC, N.; STAJCAR, D.; BASIC, I. Propolis and its flavonoid compounds cause cytotoxicity on human urinary bladder transitional cell carcinoma in primary culture. *Period. Biol.*, v. 111, n. 1, p. 113-121, 2009.

OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem. Toxic.*, v. 33 n. 9, p. 747-755, 1995

OYASU, R. et al. Induction of high-grade, high-stage carcinomas in the rat urinary bladder. *Cancer*, v. 59, p. 451-458, 1987.

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

PARK, E. H.; KAHNG, J. H. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch. Pharm. Res.*, v. 22, n. 6, p. 554-558, 1999.

PARK, E. H.; KIM, S. H.; PARK, S. S. Anti-inflammatory activity of propolis. *Arch. Pharm. Res.*, v. 19, n. 5, p. 337-341, 1996.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v. 58, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/56/artigo.htm>>. Acesso em: 4 maio 2008.

PARK, Y. K. et al. Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52 p. 1100-1103, 2004.

PARK, Y. K. et al. Determinação das atividades citotóxicas e anti- HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. *Mensagem Doce*, v. 56, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/56/artigo.htm>>. Acesso em: 4 maio 2008.

PAULING, L. Case report: lysine/ascorbate-related amelioration of angina pectoris. *J. Orthomolecular Med.*, v. 6, p. 144-146, 1991.

PAULING, L. Third case report on lysine-ascorbate amelioration of angina pectoris. *J. Orthomolecular Med.*, v. 8, p. 137-138, 1993.

PAULINO, N. et al. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea *in vitro*. *J. Pharma. Pharmacol.*, v. 54, p. 845-852, 2002.

PAULINO, N. et al. Bulgarian propolis induces analgesic and antiinflammatory effects in mice and inhibit *in vitro* contraction of airway smooth muscle. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 93, p. 307- 313, 2003.

PAULINO, N. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a braziliangreen propolis. *Planta Med.*, v. 72, p. 899-906, 2006.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*, São Paulo, v. 25, n. 2, 2002.

PINTO, M. S. et al. Efeito de estrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vaca com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Sci.*, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PITOT, H. C. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 80, p. 599-607, 1989.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer Suppl.*, v. 72, n. 3, p. 962-970, 1993.

POOL-ZOBEL, B. L. et al. Antocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells *Eur. J. Nutr.*, v. 38 n. 5 p. 227-234, 1999.

PRYTZYK, E. et al. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J. Eth. Pharm.*, v. 88, p. 189-193, 2003.

RAMOS, A. F. N.; MIRANDA, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v. 13, n. 4, p. 697-710, 2007.

RAO, C. H. et al. Inhibitory effect of caffeic acid Esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.*, v. 53, p. 4182-4188, 1993.

RAO, C. V. et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res.*, v. 55, p. 2310-2315, 1995.

RODENT BLADDER CARCINOGENESIS WORKING GROUP. Urinary bladder carcinogenesis: implications for risk assessment. *Food. Chem. Toxic.*, v. 33, n. 9, p. 797-802, 1995.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *eCAM.*, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *eCAM.*, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2007.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian green propolis: effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. *eCAM.*, v. 5 n. 3, p. 317-324, set. 2009.

SATOH, H. et al. Intravesical ultrasonography for tumor staging in an orthotopically implanted rat model of bladder cancer. *J. Urol.*, v. 177, n. p. 1169-1173, 2007.

SAWAYA A. C. H. F. et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extract by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, n. 1-2, p. 104-109, 2004.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *J. Eth. Pharm.*, v. 73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 7, n. 1, 2001.

SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 8, n. 1, 2002.

SFORCIN, J. M.; OSRSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Eth. Pharm.*, v. 98, p. 301-305, 2005.

SHARMA, M. et al. Protective role of propolis against alcohol – carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in rats. *Indian J. Pharmacol.*, v. 29, p. 76-81, 1997.

SHIMAZAWA, M. et al. Neuroprotection by brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *eCAM*, v. 2, n. 2, p. 201-207, 2005.

SILVA, J. F. M. et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.*, v. 99, p. 431-435, 2006.

SILVA FILHO, A.S. et al. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteracea). *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 56, p. 1195-1199, 2004.

SIMÕES, L. M. C. et al. Effect of brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J. Eth. Pharm.*, v. 94, p. 59-65, 2004.

SIMON, R. et al. Cytogenetic analysis of multifocal bladder supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res.*, v. 61, p. 355-362, 2001.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

SONG, Y. S. et al. Inhibition of angiogenesis by propolis. *Arch. Pharm. Res.*, v. 25, n. 4, p. 500-504, 2002.

- SONG, Y. S. et al. H. Estrogenic effect of ethanol and ether extracts of propolis. *J. Eth. Pharm.*, v. 82, p. 89-95, 2002.
- SONMEZ, S. et al. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J. Eth. Pharm.*, v. 102, p. 371-376, 2005.
- SQUIRE, R. A. et al. Histopatological evaluation of the inhibition of rat bladder carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. *Cancer Res.*, v. 37, p. 2930-2936, 1977.
- STRICKER, T. P. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins. *Patologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2013. p. 161-214.
- SUGIMOTO, Y. et al. Inhibitory effects of propolis granular A.P.C on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Let.*, v. 193, p. 155-159, 2003.
- SUZUKI, I. et al. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemoterapeutic agents. *Cancer Biother. Radiopharm.*, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2002.
- SZUMIŁO, J. Natural compounds in chemoprevention of esophageal squamous cell tumors--experimental studies. *Pol. MerkurLekarski*, v. 26, n. 152, p. 156-161, 2009.
- TAKAHASHI, T. et al. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.*, v. 58, p. 5835-5841, 1998.
- TAMER, L. et al. The effects of the caffeic acid phenethyl Ester (CAPE) on erythrocyte membrane damage after hind limb ischaemia-reperfusion. *Cell Biochem. Funct.*, v. 22, p. 287-290, 2004.
- TEIXEIRA, E. W. et al. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. *eCAM*, v. 2, n.1, p. 85-92, 2005.
- TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome- components and functional correlates. *Genes Dev.*, v. 20, p. 3215-3231, 2006.
- TOSI, E. A. et al. Food preservative based on própolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem.*, v. 104, p. 1025-1029, 2007.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *eCAM*, v. 3, n. 2, p. 249- 254, 2006.

TURKYILMAZ, S. et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on pancreatitis in rats. *J. Surg. Res.*, v. 145, n. 1, p. 19-24, mar. 2008.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, v. 34, p. 159 -163, 2004.

VOLPERT, R.; ELSTNER, E. F. Biochemical activities of propolis extracts I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Z. Naturforsch.*, v. 48, p. 851 - 857, 1993.

VURAL, A. et al. The effect of propolis in experimental acanthamoeba keratitis. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 35, p. 749- 754, 2007.

WENG, M. S. et al. Propolin H from Taiwanese propolis induced G1 arrest in human lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 5289-5298, 2007.

WILLIAMS, P. D.; LEE, J. K.; THEODORESCU, D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. *Neoplasia*, v. 10, n. 8, p. 838-846, 2008.

WOO, K. J. et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 325, p. 1215-1222, 2005.

WOO, K. J. et al. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*, v. 579, p. 705-711, 2005.

WOOD JUNIOR, Urothelial tumors of bladder In: Walsh C. Campbell's urology. 10. ed. Philadelphia: Saunders, p. 2309-2334, 2012.

YANG, J. et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res.* v. 65, n. 3, p. 939-947, 2005.

YAO, R. et al. Altered gene expression profile in mouse bladder cancers induced by hydroxybutyl (butyl) nitrosamine. *Neoplasia*, v. 6, n. 5, p. 569-577, 2004.

YU, CY. Et al. Stat3 activation is required for interleukin-6 induced transformation in tumor-promotion sensitive mouse skin epithelial cells. *Oncogene*, v. 21, p. 3949-3960, 2002.

ZAMAMI, Y. et al. Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats. *Yakugaku Zasshi.*, v. 127, n. 12, p. 2065-2073, 2007.

APÊNDICE

TABELAS PARA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGENESE

LESÕES POR BEXIGA -
PAPILOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS; HIPERPLASIA SIMPLS (PLANA), PAPILAR E NODULAR,
LESÃO DE BAIXO GRAU

GRUPO _____ RATO _____

MICROSCOPIA									
Escore	Hiperplasia Simples			Hiperplasia Papilar	Hiperplasia Nodular	Atipias		Papiloma	
	Escore inicial			Es Ini	Es Ini	1 a 3	c/ s/at	Es Ini	Lesão de Baixo Grau
	Número de camadas de células			6	6			12	Es Ini 15
Lesões	4 a 7	7 a 10	>10	3	3	c/ s/at	at	Ex End	c/at Invas?
	1 2	3	3						
1. 1									
2.									

DIFERENCIAÇÃO CELULARES MITOSE CGA Campo de Grande aumento Moderado Indiferenciado s/at sem atipia com atipia-Grau IM intramucosa SM submucosa Mucosa Serosa Peritônio Metástase NecroseAPOptose Hemorragia CCT carcinoma de células transicionais ADENOCARCINOMA Glandular ESCAMOSO Pseudoglandular HP hiperplasia renal c/ atipia s/atipia CCTcarcinoma de células transicionais Escamoso Glandular Hperplasia. T Total. Es Ini – Escore Inicial

Observação: O escore Graduação Histológica será multiplicado pela Invasão e o total multiplicado pelo subtipo de carcinoma

Observador: _____ DATA _____

TABELAS PARA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGÊNESE
LESÕES POR BEXIGA -
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS / ESCAMOSO / ADENOCARCINOMA / MISTO /

Escore	Gradação Histológica Escore inicial				Invasão					Subtipos de Carcinomas						E S C O R E
	Difere Bem 1 + Mod 2 + Ind 3 +	ATIPIAS 18 CELULAR. Baixo G 1 + Alto G 2 3 +	Nº MIT/CGA 1+ até 10 2+10a 20 3+>20	I M	SM	M U	S 4	P 5	M 6	Puro			Misto CCT+			
										A D E C	S E C	G L A	P S E U / C	G A L L A		
+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	1	3	3	3	3	3	3	
1.																

DIFERenciação CELulares MITose CGA Campo de Grande aumento Moderado Indiferenciado s/at c/at sem atipia com atipia-Grau IM intramucosa SM submucosa MUcosa Serosa Peritônio Metástase Necrose APOptose Emorragia CCT carcinoma de células transicionais ADENOCarcinoma Glandular ESCamoso Pseudoglandular HP hiperplasia renal c/ atipia s/atipia CCTcarcinoma de células transicionais Escamoso Glandular Hperplasia. T Total. Es Ini – Escore Inicial

Observação: O escore Gradação Histológica será multiplicado pela Invasão e o total multiplicado pelo subtipo de carcinoma
bservador: _____ DATA _____

TABELAS PARA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGENESE

SÍNTESE DE ESCORES DE LESÕES POR BEXIGA

GRUPO

RATO

LESÕES	Número de lesões Escolha do maior escore da lesão			Escolha de maior escore da Bexiga			T O T A L
	Escore		Escore de Partida	Escore		+ Escore inicial	
	nº lesões	Maior escore + da lesão		Lesão escolhida	Escore		
HIPERPLASIA SIMPLES							
HIPERPLASIA PAPILAR							
HIPERPLASIA NODULAR							
PAPILOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS							
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS/ESCAMOSO CCT/ESC							
LESÃO DE BAIXO GRAU							
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS/ESCAMOSO/ ADENOCARCINOMA CCT COM DIFERENCIAÇÃO ESCAMOSA, GLANDULAR PSEUDOGLANDULAR E TUMORES MISTOS: CCT + ESCAMOSO OU/E ADENOCARCINOMA							

Observações:

SÍNTESE DE ESCORES DE LESÕES POR GRUPO

PAPILOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS, HIPERPLASIA SIMPLES (PLANA), PAPILAR E NODULAR

GRUPO _____

MICROSCOPIA									
Escore	Hiperplasia Simples		Hiperplasia Papilar	Hiperplasia Nodular	Papiloma		Atipias		Lesão de Baixo Grau
	Escore inicial (0)		Es Ini	Es Ini	Es Ini	End	s/at	c/at	
	Número de camadas de células		6+	6	12				Invas?
RATOS	4 a 7	7 a 10	3+	3+	Ex				
	1+	2+							

Observação: OS VALORES DE CADA RATO CORRESPONDEM À LESÃO DE MAIOR ESCORE ALCANÇADO POR BEXIGA

Observador: _____ Data: _____

GRUPO _____ SÍNTESE DE ESCORES DE LESÕES POR GRUPO
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS / ESCAMOSO / ADENOCARCINOMA / DIFERENCIAÇÃO / MISTO

MICROSCOPIA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
E S C O R E	Gradação Histológica Escore inicial 18					Invasão					Subtipos de Carcinomas				E S C O R E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	Difere Bem 1+ Mod 2+ Ind 3+	ATIPIAS CELULAR. Baixo G 1+ Alto G 2 3+	Nº MIT/ CGA 1+ até 10 2+10a 20 3+>20	I M	S M	M U	S	P	M	T	Puro	CCTc/ diferenciação	Misto CCT+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
E S C O R E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C C T	A D E N	E S C	P S E U / G L A	E S C / G L A	A D E N	E S C / A D E N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

DIFEREnciação CELULares MITose CGA Campo de Grande aumento Moderado Indiferenciado s/at c/at sem atipia com atipia-Grau IM intramucosa SM submucosa MUScular Serosa Peritônio Metástase Necrose Apoptose HEmorragia CCT carcinoma de células transicionais ADENOCarcinoma GLANDular ESCamoso PSEUD/GLANDular HP hiperplasia renal ESCamoso GLANDular HIPERplasia. Total.

Observador: _____ Data: _____

COMPARAÇÃO DA CONCLUSÃO DO ESCORE POR RATO /GRUPO

GRUPO _____

MICROSCOPIA							
LESÃO RATO Nº	HIPERPLASIA ESCORES			PAPILOMA	LESÃO DE BAIXO GRAU		CONCLUSÃO DO ESCORE POR RATO /GRUPO
	SIMPLES PLANA	PAPILAR	NODULAR		c/at	Invasão?	
1.							ESCORE
2.							
3.							

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8338 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 03/06, sobre o projeto intitulado: **“Efeitos da própolis verde na carcinogênese e anglogênese do tumor de bexiga induzida pelo OHBBN em ratos wistar”** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 17 de maio de 2006.

Fortaleza, 23 de maio de 2006

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

OS AUTORES

Conceição Aparecida Dornelas

É médica urologista, graduada pela Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. Possui Residência Médica em Anatomia Patológica UFJF-MG. Residência Médica em Cirurgia Geral - Rio de Janeiro. Residência Médica em Urologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ - Rio de Janeiro). É Mestre em Urologia pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e Doutora em Cirurgia pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Tornou-se Bacharel em Direito pela Universidade de Fortaleza (Unifor). Exerce o cargo de professora adjunta III de Anatomofisiopatologia para o curso de Medicina. É pesquisadora e docente permanente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Patologia no Departamento de Patologia e Medicina Legal e do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médicas Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Manoel Odorico de Moraes Filho

Graduado em Medicina pela Universidade Federal do Ceará - UFC (1976), Mestre em Farmacologia pela UFC (1981) e Doutor em Oncologia pela Universidade de Oxford - Inglaterra (1989). Comendador da Ordem Nacional do Mérito Científico. Doutor *Honoris Causa* pela Universidade do Norte do Paraná. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1A. Membro Titular Colaborador do Colégio Brasileiro de Cirurgias. Membro efetivo do Conselho Estadual de Ciência e Tecnologia do Estado do Ceará. Membro titular da Academia Cearense de Medicina. Professor titular de Farmacologia Clínica da Faculdade de Medicina da UFC. Professor orientador nos Programas de Pós-Graduação em Farmacologia e Cirurgia da UFC. Realiza pesquisa na prospecção de moléculas com atividade antitumoral, oncologia experimental e farmacologia clínica. Diretor do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC (2013). Publicou 286 artigos científicos completos em periódicos especializados e 14 capítulos de livros. Orientou mais de uma centena de estudantes de iniciação científica, formou 40 mestres, 21 doutores e 9 pós-doutores.



Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará – UFC
Av. da Universidade, 2932 – fundos – Benfica
Fone: (85) 3366.7485 / 7486
CEP: 60020-181 – Fortaleza – Ceará
imprensa.ufc@pradm.ufc.br

A Universidade Federal do Ceará vem contribuindo de modo decisivo para a educação e para a ciência em nosso país. Como um dos seus avanços acadêmicos, merece destaque o crescimento da pós-graduação, que desempenha papel fundamental na formação de recursos humanos.

A pós-graduação brasileira tem sido avaliada de forma sistemática nas últimas décadas. Nesse processo, o livro passou a ser incluído como parte importante da produção intelectual acadêmica, principalmente na área das Ciências Sociais e Humanas, divulgando os esforços dos pesquisadores que veiculam parte de sua produção nesse formato.

A Coleção de Estudos da Pós-Graduação foi criada visando apoiar os programas de pós-graduação *stricto sensu* da UFC a partir de uma política acadêmico-científica, viabilizando a publicação da produção intelectual em forma de livro.

Em 2014, segundo ano de sua criação, a Coleção de Estudos da Pós-graduação apoiou a edição de 13 livros, envolvendo diversos cursos de mestrado e doutorado de diferentes áreas do conhecimento.

ISBN 978-85-7485-249-2

