

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS

**EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE NA
CARCINOGENÊSE E ANGIOGENÊSE DE TUMORES DE BEXIGA
INDUZIDOS PELO BBN EM RATAS WISTAR.**

**FORTALEZA
2009**

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS

**EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE NA
CARCINOGENESE E ANGIOGENESE DE TUMORES DE BEXIGA
INDUZIDOS PELO BBN EM RATAS WISTAR.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia

Orientador:
Professor Manoel Odorico de Moraes.

**FORTALEZA
2009**

D757e Dornelas, Conceição Aparecida

Efeitos da própolis verde na carcinogênese e angiogênese de tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas wistar / Conceição Aparecida Dornelas. – Fortaleza, 2009.
332 f.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Neoplasias da Bexiga Urinária 2. Própole 3. Lisina 4. Inibidores da Angiogênese 5. Neoplasias - terapia I. Moraes, Manoel Odorico (orient.) II. Título

CDD: 616.99462

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS

**EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE NA
CARCINOGENESE E ANGIOGENESE DE TUMORES DE BEXIGA
INDUZIDOS PELO BBN EM RATAS WISTAR.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador:
Professor Manoel Odorico de Moraes.

Aprovada em: 04/11/ 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (orientador)
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

Prof. Dr. Niraldo Paulino
Universidade Bandeirante – (UNIBAN-SP)

Prof. Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr Luiz Fernando Reis
Hospital Sírio Libanês- (SP)

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Homenagens a todos aqueles que contribuíram para minha formação
de médico e pesquisador:*

*"(...) 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 dC)*

*Homenagem especial
Prof. Francisco Hélio Rôla,
a quem tive a honra e o privilégio de ter como mestre e amigo.
Suas reflexões sobre a vida acadêmica, sobre a ciência e
o mundo em que vivemos,
aliadas ao cotidiano exercício da cidadania,
são exemplos eloquentes de seu compromisso com o outro.
Sua coerência entre o que acredita e defende é digna de nosso aplauso.
Este é um ser humano generoso, digno, íntegro, raro.
Sua inquietude plena de criatividade, cor e alegria
é motivo de orgulho e admiração!
Tesouro precioso humanístico da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará!
Vida Longa para você, Prof. Hélio!
Muito Obrigada.*

*Ao Evandro e Níki,
meus companheiros de jornada nesta vida.*

Eu agradeço:

A todos aqueles que comigo percorreram esta estrada, por alguns segundos, por alguns minutos, algumas horas, alguns dias, ou meses, nestes quatro anos que passaram. Agradeço pela dádiva dos bons momentos, pelas alegrias, pelos abraços, pelos afagos, pelos apertos de mão.

Agradeço especialmente com um abraço ao professor Manoel Odórico de Moraes, um arrojado visionário que vai ao encontro de suas visões com trabalho incansável, viga mestra na edificação de uma grande Universidade. Agradeço pela orientação neste trabalho e pelo apoio e confiança nos momentos mais difíceis.

Aos professores da Pós-Graduação de Cirurgia que, com sua generosidade, receberam-me, pacientemente, lapidando meus conhecimentos, contribuindo para a minha formação de pesquisador.

À professora Telma Lemos do laboratório de Química Orgânica, pela maravilhosa e calorosa recepção em seu laboratório encantado.

Aos professores da Fisiologia e Farmacologia, pela recepção em seus laboratórios.

Ao professor Paulo Roberto, pela sempre admirável disponibilidade e pelo convívio agradável e colaboração direta com este trabalho e orientação na histopatologia.

À professora Sílvia Helena, do laboratório de Biologia Molecular.

Ao professor Daniel, do Departamento de Radiologia pela força e incentivo nos exames de ultrassonografia.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola, em especial a Dra. Adriana, que por diversas me recebeu com um sorriso amplo e um abraço apertado, sempre que lá estive para aconselhamento e diluições.

Ao professor Julio Sidrim, pela recepção em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Paulo Roberto Carvalho de Almeida, João Batista Gadelha de Cerqueira e Francisco Vagnaldo Fachine Jamararu pela generosa e preciosa ajuda no exame de qualificação.

Aos colegas de Pós-Graduação da Cirurgia, os amigos diletos de labuta, doutores: Idália, Denise, Flávio, Rosílma, Sílmara, Sônia, Miguel, Melo,

Milena, Valmirlan, Morano, Fernando, Vilma, Marílina, Memória (quantas saudades), muito obrigada a todos vocês, camaradas de todas as horas, companheiros de risos e lágrimas, com direito a bolo verde e água de coco.

Aos amigos da Pós-Graduação da Química: doutores Irineu Albuquerque, Aluísio Fonseca, Luciana Luca, Leonardo Alves, que me ampararam nos primeiros passos.

Aos prestímosos e solidários amigos da pós-graduação da Fisiologia e Farmacologia Hemerson, Bruno, Mário Faria, Danilo, José Roberto e Gisele.

Aos carinhosos pós-graduandos da Patologia, doutores Jean, Markênia, Camila.

Às secretárias e amigas Luciene e Magda, da Pós-Graduação de Cirurgia, e Fábía, Flávia, Adelânia e Tereza, da UNIFAC, que, no cotidiano, forneceram não apenas a infraestrutura de intermediação e contatos, como também estímulo e conforto nos momentos mais difíceis.

Às técnicas do Laboratório de Oncologia Experimental, Silvania e Luciana, pelo apoio integral em todas as fases deste nosso trabalho.

Ao técnico de Biotério Sr Bento e sua família, pelo carinho, nossa gratidão.

Às técnicas do Laboratório de Patologia, em especial à Do céu, pelo seu trabalho e pela amizade incondicional.

Aos nossos acadêmicos de todos os dias Thiago Alves Dias, Adjair Jairo Silva e aos que por lá estiveram levando a sua colaboração espontânea, esporádica e sua alegria: Mateus Aguiar, Raquel Feijó, Elaine, Sílvio, Kiko, Daniel.

Ao Professor Nada Orsolíc, do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade de Zagreb na Croácia, pela gentil resposta a todos os nossos questionamentos via e-mail.

À professora Maria Cristina Marcucci, da UNIBAN, que de forma impecável realizou a tipificação e quantificação de própolis de forma extremamente colaborativa.

Minhas homenagens, meu abraço apertado a todos, com especial distinção e com minha eterna gratidão.

*Agradecimento especial
Ao amigo Professor Dr. Francisco Vagnaldo.
Não teria sido possível sem a sua ajuda.
Abraços, comovida.*

“Penso 99 vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho no silêncio - e eis que a verdade se revela!”

Albert Einstein.

RESUMO

EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE NA CARCINOGENESE E ANGIOGENESE DE TUMORES DE BEXIGA INDUZIDOS PELO BBN EM RATAS WISTAR. CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação (*Strito Sensu*) em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.

Avaliação dos efeitos da administração diária, intragástrica (ig) e subcutânea (sc) prolongada do produto hidrossolúvel da própolis verde, extraída em *L*-lisina e do aminoácido *L*-lisina ig sobre a angiogênese de carcinomas de bexiga e a carcinogênese de bexiga induzida pelo BBN (N-butil-N{4-hidroxiutil}nitrosamina) em ratas Wistar. O total de 125 ratas foi distribuído inicialmente em 14 grupos: I, IIA, IIB, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII. Os grupos de I a X receberam BBN por 14 semanas em água de beber. O grupo I foi tratado com própolis ig 150 mg/kg/peso, por 44 s, iniciado 30 dias antes do início do BBN. Os grupos IIA, III e VIII foram tratados com própolis (150 mg/kg/peso), por 40s, vias sc e ig iniciada simultaneamente com o BBN. Na 32^as, os animais dos grupos IV, V, VI, VII e IX, após ultrassonografia, foram estratificados e realocados em 4 grupos K, L, M e N, de forma que cada grupo recebesse o mesmo número de animais sem lesão vesical ou com imagem tumoral pequena, média e grande. As ratas dos grupos L, M e N, foram tratadas ig com: *L*-lisina (300mg/kg/peso), celecoxibe (30 mg/kg/peso) e própolis (300 mg/kg/peso) respectivamente, da 32^a a 40^as. Os grupos controles positivos (que receberam apenas BBN) IIB e K foram tratados com água, via sc e oral, respectivamente, por 40 s. Os grupos controles negativos XI, XII e XIII receberam nesta sequência, própolis (150mg/kg/peso), *L*-lisina (150 mg/kg/peso) e água ig por 40 semanas (s). Os grupos III e VIII foram reunidos em um único grupo, o grupo III. Os animais foram sacrificados ao final da 40^as. A carcinogênese foi estudada em todos os grupos. A angiogênese foi avaliada nos grupos K, L, M, N III e X, pela quantificação da densidade microvascular em *hot spots*, através de imunomarcagem (CD-31), utilizando-se um programa de computador. O índice de carcinogênese (21,00) e a incidência de carcinomas (20%) no grupo I, tratado com própolis 30 dias antes do início do BBN, foram menores ($P<0,05$) que os do grupo controle K (39,67% e 66,67%, respectivamente). A densidade microvascular de *hot spot* em carcinomas de bexigas foi menor ($P<0,05$) tanto em ratos tratados com própolis por 40 semanas (grupo III), quanto em tratados com própolis da 32^a a 40^as (grupo N), quando comparada com a densidade dos carcinomas de animais que receberam apenas carcinógeno (grupo K). A multiplicidade de carcinomas ($P= 0, 00267$), o índice de carcinogênese ($P<0,05$) a densidade microvascular ($P<0,05$) no grupo X (tratado com *L*-lisina) foram maiores que os do grupo controle K. Somando-se a isso, a incidência de carcinomas no grupo X foi de 100% e apresentando tumores mais invasivos ($p= 0, 0039$) que os verificados no grupo K. O grupo que recebeu apenas *L*-lisina não apresentou lesões vesicais. Isso significa que a *L*-lisina por si só não gera carcinomas. Não há descrição de efeito promotor da *L*-lisina na carcinogênese de bexiga na literatura pesquisada. A incidência de 100% de carcinomas no grupo tratado com *L*-lisina pode fazer desta modelo para estudo da carcinogênese de bexiga. Conclui-se que o produto de própolis verde administrado diariamente na dose de 150 mg/kg/peso ig, diminui a incidência de carcinomas quando iniciada 30 dias antes do BBN e inibe a angiogênese de carcinomas de bexiga na dose de 150 mg/kg/peso quando iniciada simultaneamente ou na dose de 300 mg/kg/peso após a 31^a semana do início de BBN.

Palavras chaves: própolis, lisina, inibidores da angiogênese, iniciadores de tumor, promotores de tumor.

ABSTRACT

EFFECT OF THE GREEN PROPOLIS IN CARCINOGENESE AND ANGIOGENESE OF BBN INDUCED TUMORS OF BLADDER IN RATS WISTAR.

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS. Thesis (doctorate) Post-graduation Program (strito sensu) in Surgery. Supervisor: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.

The present study evaluated the effects of prolonged, daily intragastric (ig) or subcutaneous (sc) administration of water-soluble derivative of green propolis extracted in *L*-lysine and of ig administration of *L*-lysine upon Wistar rat bladder carcinomas angiogenesis and bladder carcinogenesis induced with BBN (N-butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine). At baseline 125 rats were distributed in 14 groups (I, IIA, IIB, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII and XIII). Groups I through X received BBN in drinking water for 14 weeks. Group I was treated with propolis ig (150 mg/kg body weight) during 44 weeks beginning 30 days before challenge with BBN. Groups IIA, III and VIII were treated for 40 weeks with propolis (150 mg/kg) sc and ig initiated concurrently with BBN. By the 32nd week, the animals in Groups IV, V, VI, VII and IX were ultrasound-scanned, stratified and reallocated into 4 groups (K, L, M and N) so that the groups contained the same number of animals with small, medium and large tumors or without lesions. Groups L, M and N were treated with *L*-lysine ig (300mg/kg), celecoxib (30 mg/kg) and propolis (300 mg/kg), respectively, from the 32nd to the 40th week. Groups IIB and K (positive control groups receiving BBN only) were treated with water sc and orally, respectively, during 40 weeks. Groups XI, XII and XIII (negative control groups) received propolis (150mg/kg), *L*-lysine (150 mg/kg) and water ig, respectively, for 40 weeks. Groups III and VIII were merged into a single group (Group III). The animals were euthanized after 40 weeks. Carcinogenesis was studied in all groups. Angiogenesis was evaluated for Groups K, L, M, N, III and X using quantifying microvascular density of hot spots in histological sections stained with the marker CD-31 and analyzed with specific software. The carcinogenesis index (21.00) and the carcinoma incidence (20%) in Group I (treated with propolis 30 days prior to challenge with BBN) were smaller ($p<0.05$) than for Group K (control; 39.67 and 66.67%, respectively). The microvascular density of bladder carcinoma hot spots was smaller ($p<0.05$) for rats treated with propolis for 40 weeks (Group III) and rats treated with propolis from the 32nd to the 40th week (Group N) than for rats receiving BBN only (Group K). Carcinoma multiplicity ($p=0.00267$), carcinogenesis index ($p<0.05$) and microvascular density ($p<0.05$) were greater for Group X (treated with *L*-lysine) than for group K. In addition, the carcinoma incidence in Group X was 100%, and tumors were more invasive ($p=0.0039$) than in Group K. The group receiving only *L*-lysine presented no vesical lesions, indicating that *L*-lysine in itself does not generate carcinomas. Our review of the literature identified no reports of *L*-lysine acting as a promoter of bladder carcinogenesis. However, the 100% carcinoma incidence observed in the group treated with *L*-lysine suggests the amino acid may serve as a model for the study of carcinogenesis. In conclusion, daily ig administration of water-soluble derivative of green propolis at 150 mg/kg body weight reduced the incidence of carcinoma when initiated 30 days prior to challenge with BBN, and inhibited angiogenesis in bladder carcinoma at 150 mg/kg when initiated concurrently with BBN or when administered at 300 mg/kg after 31^a week of the initiate BBN.

Key words: propolis, lysine, angiogenesis inhibitors, carcinogens.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 01 | Mecanismo de metástase – A-Células tumorais enviam sinais para a medula óssea mobilizar BMD-MSCs (Ba), que são recrutadas pelo tumor primário, e (Bb) também mobilizadas para outros órgãos, criando um nicho pré-metastático. Para disseminação do câncer, a interação entre as BMD-MSCs com o tumor primário aumenta a motilidade, ampliando a capacidade de invasão e metástase (C), via interação parácrina (CCL5 e CCR5 quimiocina e receptor). BMD- MSCS podem se diferenciar em miofibroblasto ou outra célula estromal para suportar o crescimento e progressão tumoral (Adaptado de: HU; POLYAK, 2008)..... | 37 |
| FIGURA 02 | Angiogênese (Célula tumoral: amarela- Célula em mitose e/ou necrose: lilas - Pericitos: verde) A- Fase avascular; B- Fase de hipóxia com permeabilidade e dilatação vascular; C - Formação de brotos vasculares e recrutamento de pericitos; D- Maturação vascular; E- Crescimento do tumor (Adaptado de BERGERS; BENJAMIN, 2002)..... | 39 |
| FIGURA 03 | A - Diagrama esquemático dos mecanismos de angiogênese; B - Cortes histológicos de pele de camundongo submetido à injeção de fatores de crescimento, corados pelo giemsa-prata: B1- Intussuscepção; B2- Ponte (adaptado de PETERSSON <i>et al.</i> , 2000)..... | 41 |
| FIGURA 04 | Interação dos fatores de crescimento com seus respectivos receptores (KARAMYSHEVA, 2008)..... | 43 |
| FIGURA 05 | Ativação do STAT – (SIDDIQUEE <i>et al.</i> , 2008)..... | 45 |
| FIGURA 06 | Histogênese da carcinogênese de roedores (OYASU, 1999)..... | 56 |
| FIGURA 07 | Genes homólogos de genes humanos em ratos e camundongos submetidos à carcinogênese de bexiga pelo BBN. A concordância aumenta entre genes de roedores e genes humanos com a invasão do câncer de bexiga. *Na região central de interseção observam-se oito genes homólogos humanos tanto em ratos como em camundongos (adaptado de WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008). | 58 |
| FIGURA 08 | <i>Baccharis dracunculifolia</i> e <i>Appis millifera</i> Disponível em: http://revista.fapemig.br/materia.php?id=157 | 64 |
| FIGURA 09 | <i>Baccharis dracunculifolia</i> : A- planta masculina B- planta feminina..... | 64 |
| FIGURA 10 | Pictogramas para prevenção de contaminação humana e ambiental..... | 70 |
| FIGURA 11 | Estrutura química da L-lisina..... | 73 |
| FIGURA 12 | Própolis verde <i>in natura</i> a vácuo; B - <i>Baccharis dracunculifolia</i> , coletada em Passa Quatro, Minas Gerais (MG) e enviada para Fortaleza com a própolis..... | 74 |
| FIGURA 13 | Vegetação em torno da colmeia em Passa Quatro (MG). <i>Arbustos de Baccharis dracunculifolia</i> , entre outros..... | 75 |
| FIGURA 14 | 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..... | 77 |
| FIGURA 15 | 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..... | 78 |
| FIGURA 16 | Delineamento do experimento..... | 85 |

| | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 17 | 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..... | 86 |
| FIGURA 18 | A- aspiração de sangue arterial de aorta abdominal B- aspiração de medula óssea de fêmur..... | 87 |
| FIGURA 19 | 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 19 - Rato 7..... | 88 |
| FIGURA 20 | Mapas Para Lesões Vesicais..... | 89 |
| FIGURA 21 | frasco de 1 ml - PECAM -1..... | 95 |
| FIGURA 22 | Tonsila humana imunocorada, capilares marcados com anti-PECAM-1 (anti-CD 31) controle positivo-400x. | 96 |
| FIGURA 23 | Rim de rato imunocorado capilares glomerulares marcados por anti-PECAM-(anti- CD31) controle positivo – 400 x..... | 97 |
| FIGURA 24 | Ambiente de SAMM - A - Identificação e segmentação de vasos e células imunocoradas com cálculo da densidade de área (densidade microvascular): Área total ocupada pela microvasculatura dividida pela área total do campo analisado. B – Comprimento total de vasos e células imunocoradas..... | 98 |
| FIGURA 25 | Cromatograma (CLAE) da amostra de própolis bruta..... | 100 |
| FIGURA 26 | Cromatograma: (CLAE) de própolis liofilizada..... | 102 |
| FIGURA 27 | Estruturas dos compostos isolados: a* - Estrutura não identificada, mas tem espectro UV idêntico ao Ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxicinâmico (teria estrutura semelhante?) 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 - cafeoilquinico ou ácido 3,4 - di –o- cafeoilquínico e- Ácido p-cumárico ou ácido 4- hidroxicinamico..... | 103 |
| FIGURA 28 | Atividade antioxidante da própolis liofilizada (<i>WSDP</i>) e extrato etanólico da própolis <i>in natura</i> , ambas comparadas com o controle positivo Vitamina C e Trolox, nas concentrações de 1000, 250 e 62,5 ppm..... | 104 |
| FIGURA 29 | 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..... | 106 |
| FIGURA 30 | 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..... | 107 |
| FIGURA 31 | 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 significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados. | 108 |

- FIGURA 32** Curvas de sobrevida 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%. 113
- FIGURA 33** Curvas de sobrevida 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 ($P = 0,5964$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; L = 53,85%; M = 58,33%; N = 76,92%. 114
- FIGURA 34** 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%. 114
- FIGURA 35** 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%. 115
- FIGURA 36** Curvas de sobrevida 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 ($P = 0,0869$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%. 116
- FIGURA 37** Curvas de sobrevida 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 ($P = 0,0673$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: X = 83,33%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%. 116
- FIGURA 38** Curvas de sobrevida 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 comparações 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%. 117
- FIGURA 39** 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 2,0 cm. 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)..... | 119 |
| FIGURA 40 | A-Bexiga apresenta tumoração em nível de óstio ureteral com ureter dilatado; B- Bexiga aberta, detalhes da tumoração; C, D, E - Rim esquerdo - fistula piélica (setas), dilatação piélica - Grupo L - Rato 5..... | 120 |
| FIGURA 41 | A e B - Ultrassonografia na 31ª e 40ª 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 <i>in vivo</i> 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..... | 121 |
| FIGURA 42 | Ultrassonografia (US) 40ª semana: A- Rim direito, lojas de cálices e pelves dilatados (setas); B - US rim esquerdo (setas brancas) com discreta hidronefrose (seta vermelha); C – US de bexiga na 31ª semana D - US tumoração intravesical sólida de grande volume (3,5 x 2,5x 3,0 cm); E- Peça fixada mostra rim direito (3,0 cm) e esquerdo (2,0 cm) aumentados, ureteres dilatados, grande tumoração vesical infiltrante, envolvendo mesentério medindo 5,5 x 3,0 x 3,0 cm (Grupo N Rato 11)..... | 122 |
| FIGURA 43 | A e B: Ultrassonografia: Bexiga sem imagem tumoral na 40ª semana; C, D, E, F e G: Exame macroscópico: lesão localizada em colo vesical na parede posterior, polipoide com aspecto de couve-flor medindo 0,4 x 0,3 cm. Outras diminutas lesões podem ser observadas. Aumento de 10 x, 20 x e 40 x em microscópio estereoscópico. Grupo L - Rato 3..... | 125 |
| FIGURA 44 | 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)..... | 127 |
| FIGURA 45 | A- Abdome volumoso com massas visíveis; B e C - Ureterohidronefrose bilateral ureteres dilatados (setas e contorno de linhas brancas) e bexiga com tumor e lifonodos (setas pretas) (Grupo III - Rato 11- 35 semanas)..... | 128 |
| FIGURA 46 | A e B - Bexiga ampliada (mede 1,2 cm) 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 protusão além da parede vesical. (Grupo X - Rato 3)..... | 129 |
| FIGURA 47 | 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..... | 130 |
| FIGURA 48 | Grande tumoração vesical medindo 5,0 x 5,0 x 3,0 cm, invadindo tecidos adjacentes com áreas extensas de necrose. Os rins estão preservados (Grupo X - Rato 2)..... | 130 |
| FIGURA 49 | 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)..... | 131 |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 50 | Epitélio vesical normal A- Bexiga vazia: pregas na mucosa; B - Bexiga distendida. Cortes histológicos de parede vesical corados pela HE – 400 x. | 132 |
| FIGURA 51 | Hiperplasia plana (mais de 3 camadas de células no epitélio) - Grupo I- Rato 2 - Corte histopatológico de lesão vesical corado pelo hematoxilina eosina (HE) - 400 x | 133 |
| FIGURA 52 | 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. | 133 |
| FIGURA 53 | Hiperplasia papilar com metaplasia escamosa e lâminas de ceratina. (Grupo M - Rato 2 -100 x). Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE..... | 134 |
| FIGURA 54 | A e B - papiloma exofítico – projeções digitais de tecido transicional com um eixo fibrovascular (Grupo III - Rato 7 – 100 x, Grupo M- Rato 8- 40x) Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE. | 135 |
| FIGURA 55 | Papiloma exofítico com metaplasia glandular. Observam-se formações papilares de células transicionais e algumas delas com estruturas glandulares apresentando luz e conteúdo mucoso em seu interior. A – 100 x; B – 400 x - Grupo N - Rato 12. Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE..... | 136 |
| FIGURA 56 | 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. | 137 |
| FIGURA 57 | - A e B - Papiloma em pelve renal originário no epitélio transicional 40 x 400 x (seta detalhe ampliado (Grupo III – Rato 3). Projeções papilares de células transicionais sem invasão de parênquima renal. Corte histopatológico de lesão renal corado pela HE. | 138 |
| FIGURA 58 | - 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. | 139 |
| FIGURA 59 | 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. | 140 |
| FIGURA 60 | 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 - CCT com diferenciação formações glandulares, papilares e escamosa com pérolas córneas (setas 1, 2 e 3) 100 x (Grupo X - Rato 5). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE | 141 |
| FIGURA 61 | CCT com diferenciação oxifilica. Células com citoplasma abundante eosinofílico. Observa-se diferenciação glandular com células bigeminadas em anel de sinete (seta), (Grupo X - Rato 3). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE..... | 142 |
| FIGURA 62 | 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 5 ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste <i>t</i> para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo X (70,800 ± 15,959) foi significativamente maior (** <i>P</i> = 0,0097) que o mensurado no grupo K (39,667 ± 20,965)..... | 144 |

| | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 63 | 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, 5 do grupo X, 10 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 ($40,471 \pm 24,436$; $P < 0,05$)..... | 144 |
| FIGURA 64 | Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e K. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 10 animais do grupo I e 12 ratos do grupo K. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste <i>t</i> 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 ($39,667 \pm 20,965$; $P = 0,0153$)..... | 145 |
| FIGURA 65 | Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 10 animais do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste <i>t</i> 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 ($40,471 \pm 24,436$; $P = 0,022$)..... | 145 |
| FIGURA 66 | 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 <i>t</i> para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos III ($40,471 \pm 24,435$) e K ($39,667 \pm 20,965$; $P = 0,927$)..... | 146 |
| FIGURA 67 | Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e IIB. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 6 ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste <i>t</i> para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e IIB ($13,833 \pm 6,646$)..... | 146 |
| FIGURA 68 | Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste <i>t</i> para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1850$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e III ($40,471 \pm 24,436$)..... | 147 |
| FIGURA 69 | 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, 9 do grupo L, 10 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: $F = 1,0669$; $P = 0,3743$)..... | 147 |
| FIGURA 70 | 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 5 ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste <i>U</i> 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). | 154 |
| FIGURA 71 | 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, 5 do grupo X, 10 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. | 155 |
| FIGURA 72 | 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 7 animais do grupo IIA e 6 ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste <i>U</i> 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)..... | 156 |
| FIGURA 73 | 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 7 animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo teste <i>U</i> 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)..... | 156 |
| FIGURA 74 | 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, 5 do grupo X, 10 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; $P = 0,3308$). | 157 |
| FIGURA 75 | A e B- Bexiga fixada em formol a 10% apresentando lesão tumoral pediculada infiltrando a parede vesical até a serosa que ocupa quase completamente a luz vesical medindo 2,5 x 1,5 x 1,4 cm. A superfície de corte é sólida, cirrótica em proximidade do pedículo e necrótica em superfície da luz vesical; C - Cortes histopatológico em dois níveis da bexiga, corados pelo HE - Lâmina escaneada (Escâner HP®) Grupo VI Rato 5..... | 170 |
| FIGURA 76 | Corte histopatológico de carcinoma de células transicionais com diferenciação oxifílica (Grupo X rato 3) , observam-se em <i>hot spots</i> vasos (seta) e células imunocorados em marrom (positivo para CD 31) contracorado pela hematoxilina de Carazzi 200 x..... | 172 |
| FIGURA 77 | Comparação da densidade microvascular nos grupos K, L, M e N. A densidade microvascular no grupo N foi menor que nos grupos K (** $P < 0,01$) e L (* $P < 0,05$), ANOVA e Tukey..... | 174 |
| FIGURA 78 | Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, X e III. No grupo X foi maior que nos grupos K (** $P < 0,01$) e III (** $P < 0,001$). No grupo III foi menor que a verificada em K (++ $P < 0,01$), ANOVA e Tukey..... | 175 |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGURA 79 | Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, X e L. No grupo X foi significamente maior (** $P < 0,01$) que a mensurada nos grupos K e L, ANOVA e Tukey..... | 176 |
| FIGURA 80 | Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, N e III. No grupo K foi maior que nos grupos N (** $P < 0,01$) e III (++ $P < 0,01$), ANOVA e Tukey..... | 177 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELA 01 | Tipos de própolis quanto aos seus marcadores e distribuição geográfica..... | 63 |
| TABELA 02 | Desenho experimental inicial (1ª a 31ª semana)..... | 83 |
| TABELA 03 | Desenho experimental final (32ª a 40ª)..... | 84 |
| TABELA 04 | Escore inicial para cada lesão histopatológica vesical..... | 91 |
| TABELA 05 | Critérios para avaliação do grau de atipia..... | 94 |
| TABELA 06 | Quantificação dos marcadores identificados na própolis bruta (mg do composto/grama de própolis). | 101 |
| TABELA 07 | Quantificação dos marcadores identificados no liofilizado (mg do composto/grama do pó)..... | 102 |
| TABELA 08 | Atividade antioxidante da própolis verde bruta e liofilizada comparada à atividade antioxidante da vitamina C e Trolox nas concentrações de 1000, 250 e 62,5 ppm..... | 104 |
| TABELA 09 | 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..... | 109 |
| TABELA 10 | Mortalidade entre a 1ª semana a 31ª semana | 111 |
| TABELA 11 | Mortalidade entre a 32ª semana a 41ª semana..... | 112 |
| TABELA 12 | Causa <i>mortis</i> entre a 1ª e a 31ª semana..... | 118 |
| TABELA 13 | Causa <i>mortis</i> entre a 32ª e a 41ª semana..... | 118 |
| TABELA 14 | Número de bexigas com várias imagens tumorais na 31ª e 40ª semanas, por grupo..... | 123 |
| TABELA 15 | Número de bexigas sem imagem tumoral na 31ª semana e 40ª semana, por grupo..... | 124 |
| TABELA 16 | Correlação do número de imagens tumorais com a microscopia em ultrassonografia realizada na 40ª semana..... | 126 |
| TABELA 17 | Índice de carcinogênese obtido após somatório dos escores por rato e por grupo..... | 143 |
| TABELA 18 | Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas: Incidência de Hiperplasias, Papilomas, Lesão de Baixo Potencial Maligno e Carcinomas..... | 148 |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELA 19 | 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..... | 149 |
| TABELA 20 | 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..... | 149 |
| TABELA 21 | 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..... | 150 |
| TABELA 22 | 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..... | 150 |
| TABELA 23 | 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..... | 151 |
| TABELA 24 | 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..... | 151 |
| TABELA 25 | 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..... | 151 |
| TABELA 26 | 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..... | 152 |
| TABELA 27 | 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..... | 152 |
| TABELA 28 | Multiplicidade de carcinomas (Número de carcinomas por bexiga) com classificação por invasão e atipias..... | 153 |
| TABELA 29 | Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, X, I e III, para avaliação da multiplicidade de carcinomas..... | 155 |

| | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABELA 30 | Parâmetros utilizados na comparação dos grupos K, L, M e N para avaliação da multiplicidade de carcinomas..... | 157 |
| TABELA 31 | 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. | 158 |
| TABELA 32 | 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..... | 159 |
| TABELA 33 | – 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..... | 159 |
| TABELA 34 | 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.... | 160 |
| TABELA 35 | 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... | 160 |
| TABELA 36 | 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... | 161 |
| TABELA 37 | 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..... | 161 |
| TABELA 38 | Multiplicidade de carcinomas (Número de carcinomas por bexiga) com classificação por diferenciação e subtipos histopatológicos..... | 162 |
| TABELA 39 | 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 hitopatológica. Pode-se concluir que a proporção de tumores com grau moderadamente diferenciado foi | |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| | significativamente maior no grupo X | 163 |
| TABELA 40 | Número de ratos com subtipos histológicos de carcinomas..... | 165 |
| TABELA 41 | Número de subtipos histológicos de carcinomas por grupo..... | 166 |
| TABELA 42 | Número de bexigas com 1,2, 3, 4 e 5 carcinomas..... | 167 |
| TABELA 43 | Correlação subtipo histológico de carcinomas x invasão da parede vesical | 168 |
| TABELA 44 | Correlação do subtipo histológico de carcinomas x diferenciação histológica e atípicas..... | 169 |
| TABELA 45 | Lesões histopatológicas de maior grau evolutivo na carcinogênese observadas em cada bexiga dos ratos que morreram entre a 21 ^a e a 31 ^a semana..... | 171 |
| TABELA 46 | Densidade Microvascular pela densidade de área calculada pelo SAMM... | 173 |
| TABELA 47 | Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, L, M e N..... | 174 |
| TABELA 48 | Parâmetros utilizados para comparação dos grupos X, K e III..... | 175 |
| TABELA 49 | Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, X e L..... | 176 |
| TABELA 50 | Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, N e III..... | 177 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1 Classificação de promotores de câncer de bexiga (ITO; FUKUSHIMA, 1989)..... | 52 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAF - 2-acetilaminofluoreno
aC - antes de Cristo
ADEN - adenocarcinoma
Ang 1 - angiopoetina 1
Ang 2 - angiopoetina 2
Art C – artemillin C
BBN - N-butyl- N-[4- hidroxibutil}nitrosamina.
BCG - *bacillus calmette guerrin*
BCMN - butil (carboximetil) nitrosamina)
BCPN - butil (3-carboxipropil) nitrosamina
BD - *becton dickinson*
bFGF - fator de crescimento de fibroblastos básico
BHEN - butil (2-hydroxietil) nitrosamina
BHPN- butil (3-hidroxiopropil)nitrosamina
BMD MSCs - *bone marrow derived mesenchymal stem cells*
BOPN - butil (2-oxopropil) nitrosamina
BRG - Brasil e coniferaldeído
BRP - Brasil e prenilados
BRPG - Brasil prenilados e coniferaldeídos
C - subtipo de artemillin
CAP - ácido cafeico
CAS - *chemical abstract service*
CCT - carcinoma de células transicionais
CD - compact disc
CD 31 - *cluster differentiation*, grupamento de diferenciação (marcadores)
CEPA - Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CpG - dinucleotídio citosinas seguido por guanina
CLAE - cromatografia de alta eficiência
DAB - (3,3- diaminobenzidina) tetrahidroclorido
dC – depois de cristo
DCBEN 9-E e 9- Z - 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-ZH-1 benzopirano
 Δ MC - variação da massa corporal
DM - densidade microvascular
DNA- ácido desoxidoribonucleico
DPB - Ácido 2,2 dimetil- 8- prenil 2H- 1 benzopirano-6-propeno
DPPH - 1,1-difenil -2- picril hidrazil
ECM - matrix extracelular
EDTA - ácidoetilenodiamino tetracético
EGFb - fator de crescimento epidérmico básico
EPCs - células progenitoras endoteliais
EPI - equipamento de proteção individual
ESC - escamoso
et. al - *et alli* entre outros
EUT - eutanásia
Flk1/KDR - *fetal liver kinase-1 / kinase domain region* receptor.
Flt 1 - fms-like tyrosine kinase receptor
Flt 4- fms-like tyrosine kinase receptor
FANFT - N- {N-4-(4-(5-nitro-Z-furil)-2-thiazolil} formamida

G1 - vanila
G2 - 3 metoxi-4-hidroxi-aldeído
GSTs - glutathione S-transferase
GLAM - glandular
HIF-1 - fator de transcrição induzido por hipóxia.
HLGAGs - *heparin-like glycosaminoglycans*
HGF - fator de crescimento de hepatócito
H₂O - água
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
IARC - *International Agency for Research on Cancer*
IC50 - concentração inibitória
Ig - imunoglobulina
IGF1- fator do crescimento do tipo insulina 1
IL - interleucina
ISUP - *International Society of Urological Pathology*
IND - indiferenciado
IQ - intervalo interquartil
KDR - *kinase insert domain containing receptor*
Li - lisina
LiLi - lisina em dose dupla
MM9 - metaloproteinase de matriz
MNU - metil nitroso ureia
Nrf2 - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NaOH - hidróxido de sódio
N – ene
N° - número
OMS - Organização Mundial de Saúde
P - própolis
PA - para análise
PAI-1- inibidor do ativador do plasminogênio
PBS - *phosphate buffer saline*
p-cum - ácido p- cumárico
PECAM-1- molécula de adesão plaqueta-célula endotelial
pH - potencial hidrogeniônico
PHCA - ácido 3- prenil-4 hidroxinâmico.
PHBN - propil(4-hidroxibutil)nitrosamina
PIGF - fator de crescimento de placenta
PSEU - pseudo
PP - própolis dose dupla
ppm - parte por milhão
RNAs - ácidos ribonucleicos
RNAmi - micro ácido ribonucleico
S - semana
SAMM - sistema de análise morfométrica
Sc - subcutâneo
S/P/M - serosa/peritônio/muscular
STAT - *signal transducers and activators of transcription*
TGF-b - fator de crescimento transformador
TIMPs - inibidor tecidual de metaloproteinase
TK1 - timidina cinase 1

TSP-1 - trombospondin-1
UDP - *glucuronosyltransferase*
UFC - Universidade Federal do Ceará
UGTs - uridinodifosfato glucoronosil transferase
UNIBAN - Universidade Bandeirante de São Paulo
UV - ultravioleta
VEGF - fator de crescimento endotelial
VPF - fator de permeabilidade vascular
VEGF- fator de crescimento endotelial A
VHL - von hipel lindeau
WHO - World Health Organization
WSDP - *water soluble derivative propolis*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 031 |
| 1.1 Câncer de bexiga..... | 031 |
| 1.2 Carcinogênese | 033 |
| 1.3 Angiogênese..... | 039 |
| 1.4 Modelo para estudo da carcinogênese de bexiga..... | 049 |
| 1.5 Própolis..... | 059 |
| 1.6 A extração da própolis..... | 066 |
| 1.7 Relevância e Justificativa..... | 067 |
| 2. OBJETIVOS..... | 068 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 068 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 068 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 069 |
| 3.1 Animais..... | 069 |
| 3.2 Condições de manutenção do biotério e proteção individual e ambiente..... | 069 |
| 3.3 As substâncias utilizadas..... | 071 |
| 3.4 A extração da própolis em <i>L</i> lisina..... | 074 |
| 3.5 Tipificação e quantificação da própolis..... | 079 |
| 3.6. Teste de atividade antioxidante..... | 079 |
| 3.7. Delineamento do experimento..... | 080 |
| 3.8 Exames de ultrassonografia..... | 086 |
| 3.9 Eutanásia..... | 087 |
| 3.10 Estudo da macroscopia da Bexiga fixada em Formol..... | 088 |
| 3.11 Avaliação da carcinogênese Análise histopatológica..... | 090 |
| 3.12 Avaliação da angiogênese tumoral por imunohistoquímica..... | 094 |
| 3.13 Quantificação da angiogênese tumoral..... | 097 |
| 3.14 Análise estatística..... | 099 |
| 4. RESULTADOS..... | 100 |
| 4.1 Tipificação da própolis..... | 100 |
| 4.2 Atividade antioxidante..... | 104 |
| 4.3 Resultados do experimento com animais..... | 105 |
| 4.3.1 Variação temporal da massa corporal..... | 105 |
| 4.3.2 Avaliação do peso corporal, fígado, baço e rins..... | 108 |
| 4.3.3 Consumo de própolis e <i>L</i> -lisina..... | 110 |
| 4.3.4 Evolução clínica, mortalidade, sobrevida e causa <i>mortis</i> | 110 |
| 4.3.4.1 Evolução clínica..... | 110 |
| 4.3.4.2 Mortalidade..... | 110 |
| 4.3.4.3 Sobrevida..... | 113 |
| 4.3.4.4 Causa <i>mortis</i> | 118 |
| 4.3.5 Ultrassonografia..... | 121 |
| 4.3.6 Exame macroscópico..... | 127 |
| 4.3.7 Avaliação microscópica de carcinogênese..... | 132 |
| 4.3.7.1 Índice de carcinogênese..... | 142 |
| 4.3.7.2 Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas..... | 147 |
| 4.3.7.3 Avaliação estatística da incidência de carcinomas de bexiga..... | 149 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.7.4 Avaliação da multiplicidade de carcinomas..... | 152 |
| 4.3.7.5 Grau de invasão | 158 |
| 4.3.7.6 Grau de atipias..... | 161 |
| 4.3.7.7 Grau de diferenciação..... | 162 |
| 4.3.7.8 Subtipos histopatológicos de carcinomas..... | 164 |
| 4.3.8. Avaliação macroscópica e histopatológica da carcinogênese de | |
| ratos que foram a óbito entre a 1ª e 31ª semana. | 170 |
| 4.3.9. Resultados da quantificação e estatística da angiogênese..... | 172 |
| 5. DISCUSSÃO | 178 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 197 |
| 7. REFERÊNCIAS | 198 |
| APÊNDICE A Protocolo para manipulação de carcinógeno..... | 224 |
| APÊNDICE B Tabela de médias de pesos e consumo de própolis por grupos..... | 229 |
| APÊNDICE C Tabelas para avaliação do índice de carcinogênese..... | 233 |
| APÊNDICE D Dados brutos dos pesos de corpo, fígado, baço e rins por rato/grupo... | 240 |
| APÊNDICE E Dados brutos das dimensões das imagens na 31ª e 40ª semanas. Correlação com macroscopia e microscopia por rato/grupo..... | 245 |
| APÊNDICE F1 N° de tumores por bexiga e classificação por invasão e atipias por rato/grupo..... | 255 |
| APÊNDICE F2. Número de carcinomas e sua classificação por atipias por rato/grupo análise estatística..... | 260 |
| APÊNDICE F3 Número de carcinomas e sua classificação por diferenciação e subtipos histopatológicos por rato/grupo..... | 263 |
| APÊNDICE F4 Análise estatística do número de carcinomas e sua classificação por diferenciação histopatológica..... | 268 |
| APÊNDICE F5 -Análise estatística do número de carcinomas e sua classificação por subtipos histopatológico | 271 |
| APÊNDICE G Quantificação morfométrica. SAMM por triplicata por bexiga/grupo. | 274 |
| APÊNDICE H Publicações..... | 280 |
| APÊNDICE I Ensaio do Cometa..... | 313 |
| APÊNDICE J Ensaio do Micronúcleo..... | 314 |
| APÊNDICE K Ensaios com sarcoma 180 e tumor de Walker..... | 315 |
| APÊNDICE L Angiogênese perivascular: tumor de Walker..... | 317 |
| ANEXO A Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEPA- UFC..... | 320 |
| ANEXO B Laudo de análise do extrato da própolis de Passa Quatro MG..... | 321 |
| ANEXO C Composição da ração consumida pelos animais | 322 |
| ANEXO D <i>MATERIAL SAFETY DATA SHEET</i> (MSDS) do BBN..... | 323 |
| ANEXO E Certificado de qualidade da L- lisina..... | 328 |
| ANEXO F Patente traduzida..... | 329 |

/

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de bexiga

O câncer de bexiga tem alta prevalência, principalmente no norte da Europa, em especial na Escócia e Dinamarca (FUKUSHIMA; WANIBUCHI, 2000). 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). Estima-se que em 2009, nos EUA, serão diagnosticados 70.980 casos e morrerão 14.330 pessoas (Nacional Cancer Intitute, 2009). Na Coreia e na China, é o tumor do sistema urinário mais frequente. É uma doença associada à exposição direta de substâncias em indústrias químicas, contaminação da água pelo arsênico, tabagismo, contaminação radioativa (pós bombas atômicas no Japão e desastre de Chernobil na Ucrânia), abuso de uso de analgésicos (fenacetina, paracetamol) e a esquitossomose 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 associado 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

proposta 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; inúmeras instilações intravesicais 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 muito propícia ao aumento progressivo desta doença, evidenciada em observações clínicas e epidemiológicas.

1.2 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo com múltiplas etapas que envolvem múltiplos eventos genéticos e epigenéticos (YU; WANG; KHANLETSKIY, 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 (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2009).

Os protooncogenes 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-MYC, ciclina D, ciclina E CDK. Os genes supressores de tumor necessitam 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 protooncogenes, genes supressores do tumor e genes que regulam a apoptose. A incapacidade de genes do reparo deixa a célula susceptível a transformação neoplásica. Ambos os genes do reparo devem ser inativados para induzir instabilidade genômica (STRICKER; KUMAR, 2009).

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 a 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 protooncogenes, 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 protooncogenes 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; KUMAR, 2009).

O crescimento celular normal é o resultado de um balanço entre controle positivo (protooncogenes 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 protooncogene mutado (oncogene) é ativado, é necessário que esteja atuando um gene supressor para que ponha um fim à proliferação. 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 3 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; KUMAR, 2009).

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, agentes carcinogênicos em altas doses em condições específicas pode-se aplicar 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 evolução de anormalidades cromossômicas 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 (micromeioambiente) no desenvolvimento do câncer é fundamental. Ele não apenas suporta a carcinogênese, mas 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, da invasão, para a angiogênese e para o comportamento metastático de células cancerosas.

Nem sempre, a caracterização de anormalidades genótípicas 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-MSDCs podem se diferenciar em miofibroblasto e outras células estromais para suportar o crescimento e progressão do tumor (HU; POLYAK, 2008) (Figura 1).

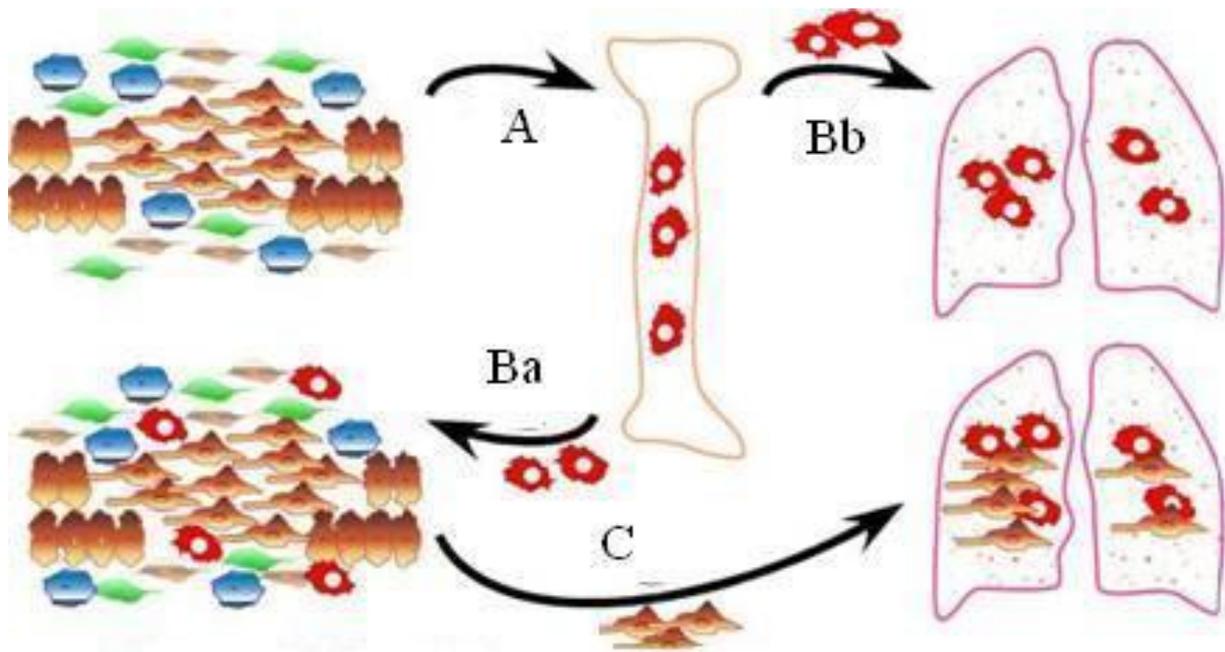


FIGURA 1 – Mecanismo de metástase – *Stem Cells* medulares, células tumorais, Leucócitos, miofibroblastos, fibroblastos. A- Células tumorais enviam sinais para a medula óssea mobilizar BMD-MSCs (Ba), que são recrutadas pelo tumor primário, e (Bb) também mobilizadas para outros órgãos, criando um nicho pré-metastático. Para disseminação do câncer, a interação entre as BMD - MSCs com o tumor primário aumenta a motilidade, ampliando a capacidade de invasão e metástase (C), via interação parácrina (CCL5 e CCR5 quimiocina e receptor). BMD - MSCS podem se diferenciar em miofibroblasto ou outra célula estromal para suportar o crescimento e progressão tumoral (Adaptado de: HU; POLYAK, 2008)

Pesquisadores estão concentrados nas alterações moleculares observadas nas 3 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 STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5A, STAT 5B e STAT 6, que são codificados por diferentes genes (CALÓ *et al.*, 2003).

O STAT 3 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 STAT 3 são mediados, manifestam-se através da expressão de genes alvos de STAT 3. Os genes alvos 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 STAT 3 sempre ser citada como importante para a oncogênese, achados experimentais têm sugerido que o STAT 3 ativado não fosforilado (porém submetido a mutação por vírus) tem sido capaz de induzir a expressão de alguns genes regulados pelo STAT 3 fosforilado como os genes c-fos, c-jun, bcl-x1 , c-mic dp-1. Isto sugere que o STAT 3 ativado não fosforilado pode também contribuir para a carcinogênese (YANG *et al.*, 2005; LEEMAN-NEILL, 2008).

O STAT 3 não apenas está envolvido no processo da oncogênese, mas igualmente é necessário na angiogênese, fundamental para desenvolvimento, invasão e metástase tumoral.

1.3 Angiogênese

A palavra angiogênese foi publicada pela primeira vez em 1900, em artigo sobre desenvolvimento das suprenais por Rudolf Steiner. A palavra seria empregada novamente por Arthur Herting, em 1935, em pesquisas sobre a placenta (COOKE, 2001).

Em 1945, Algire e Halk foram os primeiros a concluir que o crescimento de tumores sólidos estava intimamente ligado ao desenvolvimento de uma rede vascular intrínseca (ALGIRE; CHALKLEY, 1945). Porém, o estudo da angiogênese em sua plenitude teve início com Folkman, cirurgião pediátrico que, nos anos 70, formulou a hipótese de que, inibindo o suprimento sanguíneo de um tumor, poderia deter o seu crescimento ou eventualmente obter a sua redução (EICHHORN *et al.*, 2007).

Uma vez ocorrida a mutação genética em uma célula iniciada, bem como a promoção da carcinogênese, tem-se uma fase avascular, na qual as células são supridas por difusão até que atinja um volume de 1 a 2 mm³. Alguns tumores podem permanecer por longo tempo nessa fase (FOLKMAN, 2004). Sendo assim, a aquisição de um fenótipo angiogênico é fundamental para a progressão tumoral, sua invasão e metástase. (Figura 2).

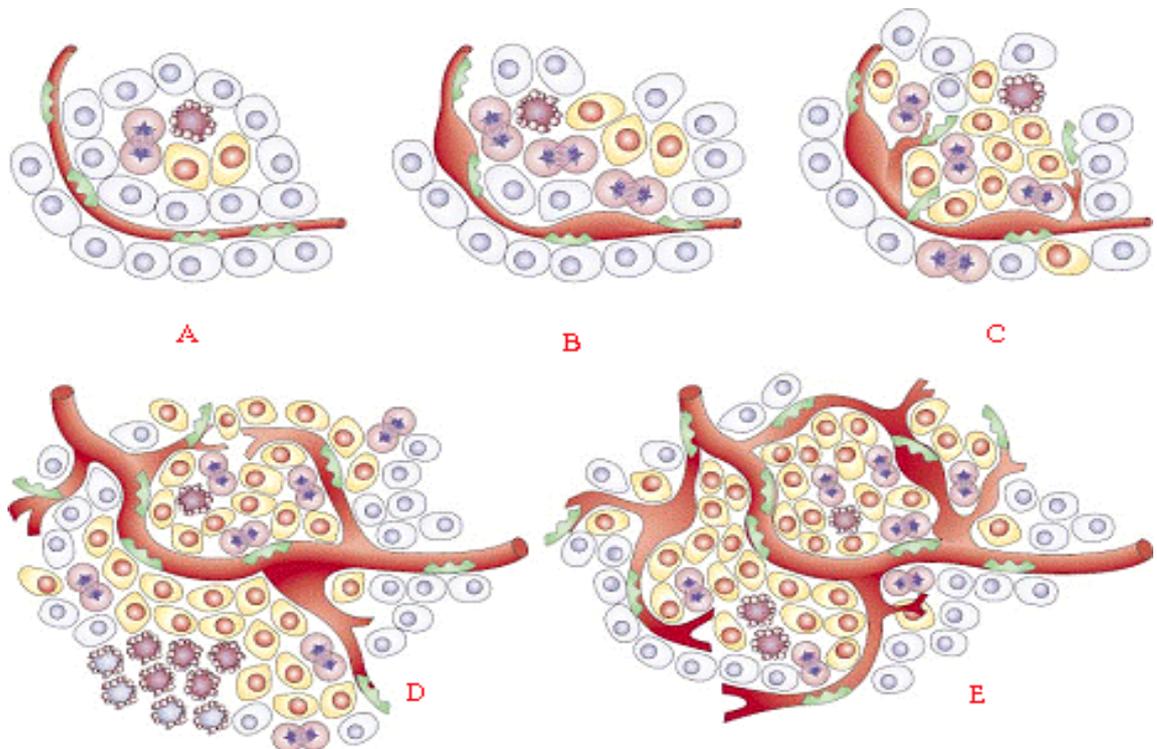


FIGURA 2 – Angiogênese (Célula tumoral: amarela- Célula em mitose e/ou necrose: lilas - Pericitos: verde) A- Fase avascular; B- Fase de hipóxia com permeabilidade e dilatação vascular; C - Formação de brotos vasculares e recrutamento de pericitos; D- Maturação vascular; E- Crescimento do tumor (Adaptado de BERGERS; BENJAMIN, 2002).

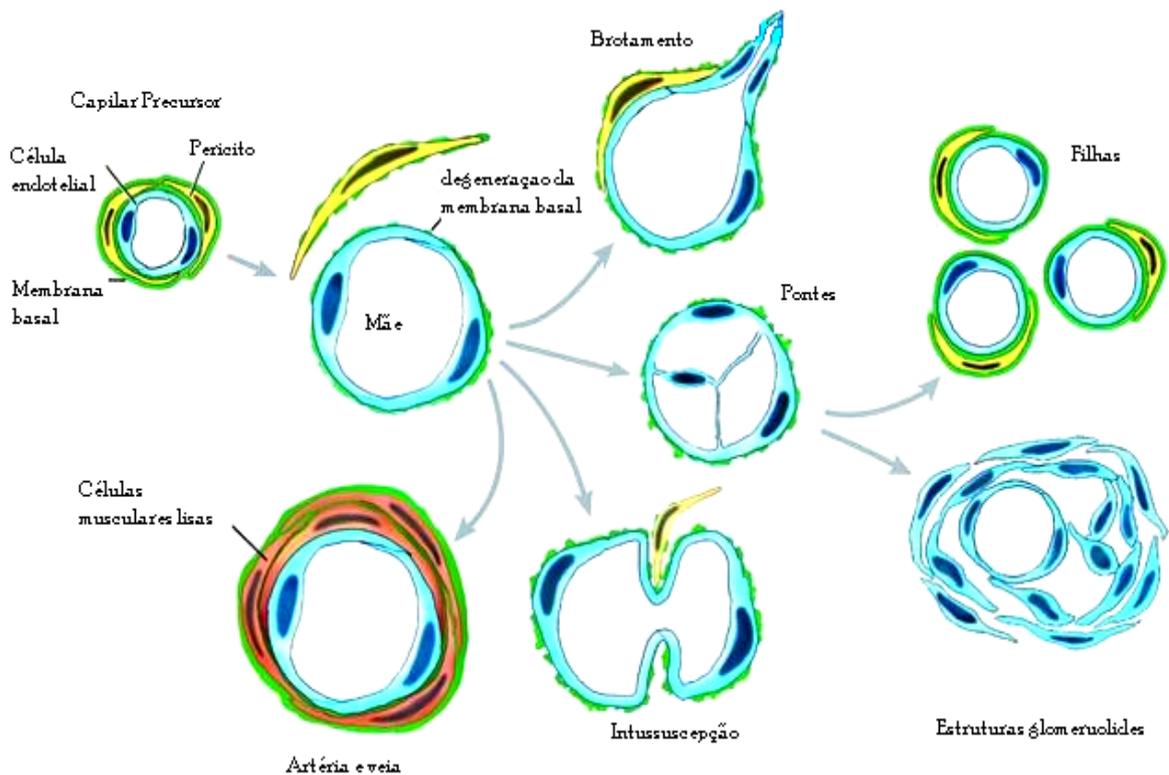
Carcinomas mais agressivos são capazes de organizar vasos cujas paredes são as próprias células tumorais, formando canais, permitindo um crescimento e invasão mais rápidos chamada *vasculogenic mimicry* (BERGERS; BENJAMIN, 2002; FOLBERG; MANIOTIS, 2004; PETTY et al., 2007; ROBERTSON, 2007).

Um vaso sanguíneo pode se originar da angiogênese ou da vasculogênese. A angiogênese é o brotamento de microvasos, principalmente a partir de vênulas, arteríolas e capilares sanguíneos pré-existentes. A vasculogênese é o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de proliferação de células mesodérmicas progenitoras endoteliais (EPCs) e angioblastos. (AUSPRUNK; FOLKMAN, 1977; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). A arteriogênese trata-se do recrutamento de células periendothelias: pericitos e células musculares lisas que vão dar sustentação à camada endotelial formada na angiogênese, proporcionando maior estabilidade ao vaso (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

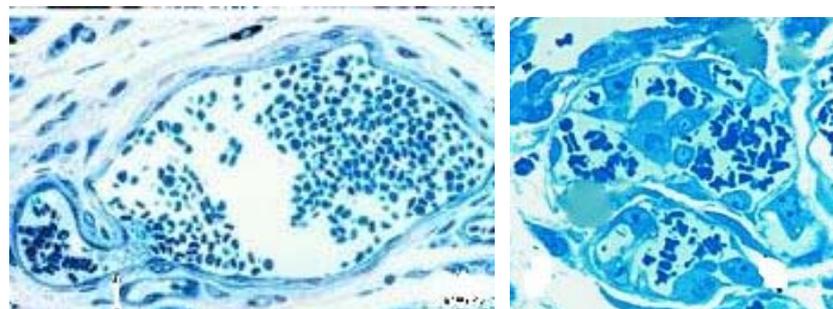
A fase vascular neoplásica é caracterizada pela rápida proliferação celular neoplásica. O crescimento tumoral necessita de novos capilares, e a perfusão advinda destes novos vasos passa a ser o mecanismo de nutrição, oxigenação e eliminação de metabólitos. A maioria dos tumores tornam-se detectável clinicamente somente a partir dessa fase.

A angiogênese é essencial para a reprodução, para embriogênese e para o desenvolvimento e reparo, no entanto, angiogênese patológica pode ocorrer, não apenas no desenvolvimento de câncer e suas metástases, mas também em doenças não neoplásicas, que são classificadas como doenças dependentes de angiogênese, como no caso da psoríase, hemangiomas, úlceras pépticas, artrite reumatóide, retinopatia diabética, endometriose, doença de crohn, hiperplasia prostática e aterosclerose (MOULTON *et al.* , 2003; FOLKMAN, 2007).

A gênese de um vaso a partir de outro existente ocorre de 3 formas distintas: por brotamento, em que a migração de células endoteliais se direciona para o espaço extravascular formando brotos laterais; por intussuscepção, quando a parede do vaso, através de células periendothelias, invagina formando um septo que divide o vaso longitudinalmente (dividindo o vaso em dois), e através do surgimento de pontes celulares transendoteliais no interior do capilar (por vários septos), levando a um fracionamento da luz vascular, formando pequenos canais, que se desprendem formando novos vasos, ou formando estruturas imaturas conhecidas como corpúsculos glomeruloides (PETTERSSON *et al.*, 2000; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; DEVORAK, 2003) (Figura 3).



A



B1

B2

FIGURA 3 - A - Diagrama esquemático dos mecanismos de angiogênese; B - Cortes histológicos de pele de camundongo submetido à injeção de fatores de crescimento, corados pelo giemsa-prata: B1- Intussuscepção; B2- Ponte (adaptado de PETERSSON *et al.*, 2000).

O estroma é o responsável pela nutrição e eliminação das excretas do parênquima, portanto, encontra-se nele o palco da angiogênese (DVORAK, 2003).

Parênquima e estroma tumoral encontram-se inseridos em meio a estroma de tecido conjuntivo normal. Mas existem diferenças entre um estroma e outro, principalmente no que se refere a vasos sanguíneos. Os vasos tumorais diferem com relação à organização, estrutura e função. Não possuem um padrão de arranjo hierárquico, mas se estendem irregularmente; são hiperpermeáveis ao plasma e às proteínas plasmáticas; podem estar ausentes pericitos e está sempre circundado por células endoteliais, dividindo-se ativamente. As células endoteliais tumorais se dividem 50 vezes mais frequentemente e expressam maior

quantidade de moléculas de superfície (VEGF receptores, integrinas, seletinas, endoglinas) do que as células (LONGO et al., 2002). Outros elementos do estroma tumoral também se apresentam diferentes, como a presença de fluido intersticial plasmático rico em proteínas, bem como de proteínas estruturais não encontradas em estroma maturo, como a fibrina, formas fetais de fibronectina, proteoglicanos anormais e um número variável de células inflamatórias. (DVORAK; KOHN; MORGAN, 1996; DVORAK, 2003; NAGY *et al.*, 2008).

A cascata da angiogênese, inicia-se pela ativação dos receptores das células endoteliais em resposta aos fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais. Uma vez ativado pela presença do óxido nítrico e do VEGF, os receptores da rede vascular adjacente ao tumor responde com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A seguir, outras moléculas produzidas pelas células endoteliais e pelas células tumorais (metaloproteinases, ativador do plasminogênio) vão degradar a membrana basal e as junções entre as células endoteliais, produzindo a migração e proliferação das células endoteliais em direção ao foco onde originou o estímulo angiogênico, formando brotos capilares. Esse brotos capilares se formam como resultado da migração direcional da célula endotelial. Após a formação do lúmen, novos elementos da matriz celular são incorporados ao novo vaso, formando a membrana basal, com maturação do vaso por recrutamento de células periendothelias (JAIN, 2003).

VPF (fator de permeabilidade vascular) foi descoberto quando pesquisadores injetaram sobrenadante de cultura de células tumorais e líquido ascítico tumoral em pele de cobaias, resultando em aumento de permeabilidade vascular, incapaz de degranular mastócitos e incapaz de ser inibido por anti-histamínicos. Estudos *in vitro* posteriores, isolando e clonando o VPF, mostraram que este era mitogênico e capaz de induzir à angiogênese. Dessa forma, o VPF se tornou conhecido como fator de crescimento endotelial vascular VEGF e mais recentemente como VEGF-A (DVORAK, 2003; EICHHORN *et al.*, 2007).

O VEGF é a molécula angiogênica mais potente. É um mitogênico para células endoteliais provenientes de artérias, veias e linfáticos. Atualmente se conhecem seis VEGF (VEGF A, B, C, D e E e PlGF - fator de crescimento placentário). Um único gene apresenta 8 exons e dessa forma várias isoformas de VEGF podem ser geradas (VEGF 121, 165, 189, 206, 145, 183) (TISHER *et al.*, 2001; FERRARA, 2001; LONGO *et al.*, 2002).

O VEGF ativa células endoteliais através de sua ligação com receptores VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (Flk1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4)3. Esses receptores encontram-se no endotélio vascular e estão aumentados durante a angiogênese. Eles pertencem a uma

superfamília de receptores tirosinos cinases (RTK). Parece que todos os RTK dos VEGF receptores são proteínas transmembranas. A região extracelular dos VEGFR é formada por 7 imunoglobulinas/semelhantes (IG I a VII), formando um único domínio, ao passo que a parte intracelular exibe atividade tirosino cinase e o domínio é separado em dois segmentos (TK1 e TK2) intercalados por uma intercinase. VEGFA interage com receptores VEGFR1 e VEGFR2 (KARAMYSHEVA, 2008) (Figura 4).

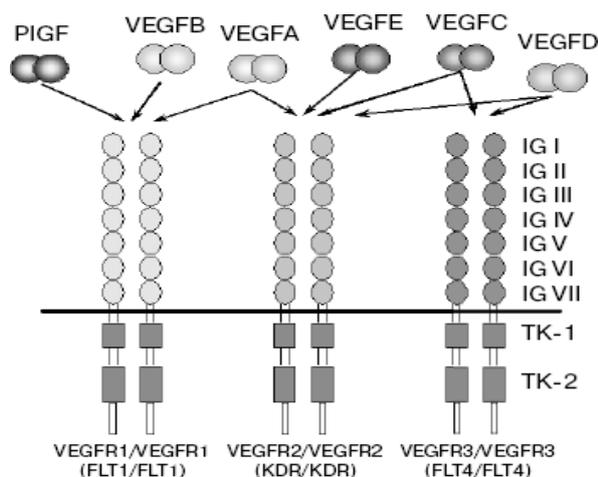


FIGURA 4 - Interação dos fatores de crescimento com seus respectivos receptores (KARAMYSHEVA, 2008).

Uma vez ligado o VEGF A ao receptor VEGFR2, sinaliza para a ocorrência de mitogênese, permeabilidade e a sobrevivência das células endoteliais de capilares sanguíneos. A ligação com os receptores VEGFR1 estimula a migração celular. O VEGF A é responsável pela angiogênese e VEGF C e D pela linfangiogênese. O receptor VEGFR3 é expresso pelas células de linfáticos e sua ligação ao VEGF C e D promove a mitose de células endoteliais linfáticas (LONGO *et al.*, 2002). A permeabilidade aumentada pelo VEGF ligado ao seu receptor permite que a célula endotelial capte a molécula do lúmen e a transporte em pequenas vesículas para o ablúmen. Isso também ocorre pelas junções pericelulares em casos de hiperpermeabilidade vascular crônica, como a encontrada nos tumores e em doenças inflamatórias (DVORAK; KOHN; MORGAN, 1996; DVORAK, 2003)

O VEGF, mediante diferentes interações com seus receptores tirosinocinases e não protéicos, como neutropilin 1 e 2, é responsável pela proliferação e migração de células endoteliais, expressão de quimiocinas, citocinas e metaloproteínas na matriz extracelular. (FERRARA, 2001; EICHHORN *et al.*, 2007).

O PIGF (fator de crescimento placentário), pertencente à família VEGF, quando estimulado inicialmente, promove o recrutamento, a quimiotaxia e a mobilização de células

tronco e progenitoras circulantes. Posteriormente, eles se tornam mediadores da superexpressão de metaloproteinase 9 (MM9), favorecendo a diferenciação, mobilização e construção vascular.

As células carcinomatosas estimulam a angiogênese pela produção de vários fatores, como o VEGF, FGF1 e FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto 1 e 2), bFGF (EGFb básico), EGF (fator de crescimento epidérmico), IL8 (interleucina 8) e TGF- β (fator de crescimento transformante). Além das células cancerosas e células endoteliais do tumor, células do estroma tumoral, e também células circulantes do hospedeiro, como plaquetas, EPCs e macrófagos que secretam moduladores de angiogênese (EICHHORN *et al.*, 2007).

Essa dinâmica de proliferação e migração celular é bastante complexa e depende de uma série de alterações locais, como a hipóxia, diminuição do PH, deprivação de nutrientes e indução de espécies reativas de oxigênio, que vão gerar citocinas e dar início à angiogênese. Além dos sinalizadores citados, alterações genéticas em oncogenes e genes supressores, entre eles o RAS, MYC, RAF, HER-2/neu, c-JUN e SRC, podem aumentar a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), desencadeando a angiogênese ou a suprimindo, como é o caso do trombospodim-1 (TSP-1), um supressor de angiogênese. O P53 mutado aumenta o VEGF, e o selvagem diminui a produção de VEGF e aumenta o TSP-1, levando à inibição de angiogênese (LONGO *et al.*, 2002).

Enquanto existem múltiplos receptores e proteínas oncogênicas intracelulares indutoras de VEGF (normalmente ativadas no câncer), poucos ativadores de transcrição têm sido descritos com o propósito de aumentar a produção deste fator de crescimento. Os dois comumente citados são o HIF-1 (Fator induzível de hipóxia 1) e o STAT3 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), ambos estão superexpressados em diversos tumores (XU *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2007).

O HIF-1 regula a expressão de VEGF e é composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β . A atividade biológica do HIF-1 depende da quantidade de HIF-1 α que, na maioria das vezes, é regulada pela tensão de oxigênio. Não apenas a hipóxia, mas muitos genes supressores de tumor estimulam a cascata de fosforilação e afetam a expressão de HIF-1 α , independentemente da tensão de oxigênio. Quando fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de fibroblastos, IL 1 B 1,2 e fator de crescimento semelhante à insulina IGF1 e 2) se ligam aos receptores quinases, podem modular ou ativar a via do HIF-1 α por estimular a cascata da fosforilação. Um dos genes alvos do HIF-1 α é o gene VEGF (existem pelo menos 70 genes alvos do HIF-1 α reguladores de oxigênio). Ao se ligar ao gene, o HIF-1 α deve ainda interagir com outros fatores de transcrição ligados a sítios

adjacentes. O HIF-1 α é degradado pela VHL proteína supressora de tumor (Von Hippel - Lindau). Por isso, em tumores sólidos, o HIF-1 α apresenta-se aumentado pela hipóxia intratumoral e através da perda da função da VHL e do p53 (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; XU *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2007).

O STAT3 aumenta a expressão de Akt, um gene requerido para a expressão de HIF-1 basal, e a induzida por sinal, com isso aumentando também a produção de VEGF. O STAT3 é requerido para a expressão de HIF e VEGF induzidas por oncoproteínas ativadas no câncer.

A ativação dos STATs é iniciada pela fosforilação no momento em que ocorrem as ligações de fatores de crescimento ou citocinas aos seus receptores na superfície celular. Os STATs são recrutados para a porção citoplasmática dos receptores e lá iniciada a fosforilação, em resíduo tirosil (Fator de crescimento e receptores tirosino cinase, em receptores não tirosino cinase, como Jaks, Src ou Abelson cinase ou diretamente sem ligação com receptores). O resíduo tirosino fosforilado e STAT ativado através de dimerização se translocam até o núcleo regulando a transcrição de genes específicos, cumprindo o seu papel de transdutor de sinal e ativador de transcrição (SIDDIQUEE *et al*, 2008) (Figura 5).

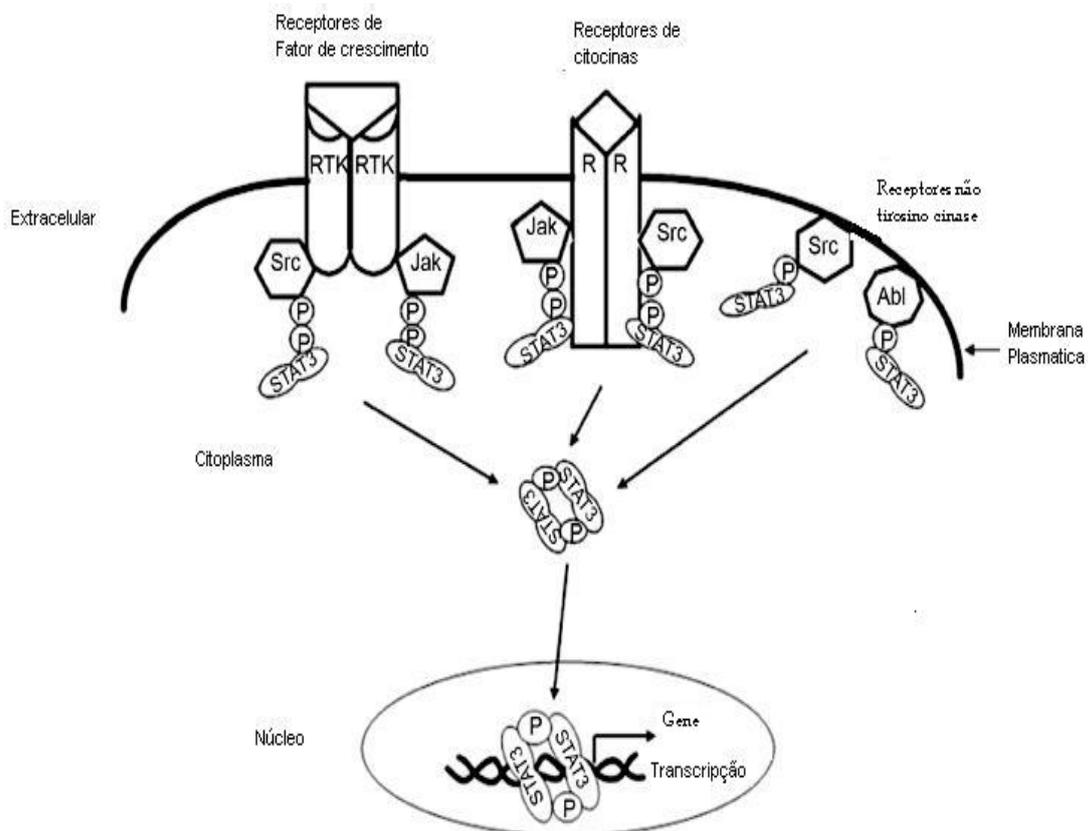


FIGURA 5 - Ativação do STAT – (SIDDIQUEE *et al.*, 2008)

O STAT3, como visto anteriormente, também está relacionado com a inibição da maturação de células dendríticas, sobrevida e proliferação celular, invasão, metástase. Pesquisas bloqueando a STAT3 *in vivo* obtiveram a inibição da proliferação tumoral, indução de apoptose, inibição da resposta imune e da angiogênese. Dessa forma, o STAT3 parece ser um excelente alvo para tratamento de neoplasias (XU *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2007; SIDDIQUEE *et al.*, 2008).

As angiopoietinas (Ang1 e Ang2) são responsáveis pela estabilização do vaso e podem ser produzidas por muitos tumores. São citocinas que, ao se ligarem aos receptores Tie-2, podem promover a sobrevida celular endotelial e estabilizar o vaso pelo recrutamento de pericitos (Ang1) ou causar perda de pericitos com desestabilização do vaso (Ang2). A Ang2 está aumentada em tumores muito vascularizados.

Também os FGFs (fatores de crescimento de fibroblastos) estimulam a proliferação e a diferenciação de células endoteliais. Podem ser FGF1 e FGF2 (ácidos ou básicos, respectivamente) e se ligam a receptores HLGAGs (heparina, sulfatoproteoglicans) na matriz extracelular (ECM). São descritos como indutores de angiogênese. Eles também podem se ligar a receptores transmembranas específicos tirosinos cinases, induzindo sua ativação e dimerização e com isso estimulando a proliferação de células endoteliais e diferenciação de células epiblasticas em células endoteliais (EICHHORN *et al.*, 2007).

Mas a presença de fatores angiogênicos não é suficiente para iniciar um novo crescimento vascular. Fatores angiogênicos são contrabalançados por numerosas moléculas inibidoras, como TSP-1 Angiostatina, endostatina, vasostatina, interferon α e β , tumstatina e interleucina 12. Durante o processo de angiogênese normal, existe um controle delicado entre fatores pró e antiangiogênicos. Mas no caso de tumores malignos, esse controle é perdido e dessa forma persiste então um crescimento contínuo de vasos.

As plaquetas são um bom exemplo de potentes pró-angiogênicos. Seus grânulos α carregam grande quantidade de PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas) e bFGF (fator de crescimento do fibroblasto). As plaquetas podem secretar fatores que podem estimular ou inibir a angiogênese, como é o caso do HGF (fator de crescimento do hepatócito). O Trombospondin 1 (TSP-1) é o mais abundante constituinte dos grânulos α , além de participar da agregação plaquetária, pertence à família das proteínas da ECM. Possui um importante receptor celular, o CD36, que está presente no endotélio, e é necessário para sua atividade antiangiogênica (ainda controverso). Uma vez ativado, ele vai levar à apoptose da célula endotelial. O TGF β 1 (fator transformador ativador de plaquetas) também inibe a

proliferação e migração celular. O PAI-1 (Inibidor tipo I do plasminogênio) é outro inibidor (BROWDER; FOLKMAN; PIRIE-SHEPHERD, 2000).

A angiostatina é um fragmento de plasminogênio que pode inibir a angiogênese e metástase. A angiostatina tem um efeito inibidor na matriz extracelular, reduzindo a migração e invasão da célula endotelial. Já a Endostatina é um fragmento de colágeno XVIII, um proteoglicano encontrado na parede de vasos e membrana basal. Representa uma poderosa citocina que inibe a migração da célula endotelial, levando à apoptose celular (EICHHORN *et al.*, 2007).

O VEGF-A é um regulador da expressão de proteases nas células endoteliais que degradam a membrana basal. Assim, entram em cena novos atores: as metaloproteinases e integrinas. As metaloproteinases, atualmente em número de 28, já isoladas, vão fragmentar a matriz celular e abrir espaço para a proliferação e migração de células endoteliais. A ativação das integrinas é necessária para a adesão da célula endotelial à matriz, à migração e à sobrevivência celular. As integrinas têm uma função indireta, pois estimulam o TSP-1, que ativa o TGF β , que por sua vez aumenta a síntese de TIMPs, que vão inibir as metaloproteinases; e uma função direta, quando elas ativam metaloproteinases com degradação de MEC e liberação de Tumstatina (antiangiogênico). Os receptores de integrina $\alpha\gamma\beta$ são superexpressados pelas células endoteliais ativadas (LONGO *et al.*, 2002).

O Óxido Nítrico tem um papel ambíguo na progressão tumoral e por vezes com ações antitumorais levando à apoptose e à citotoxicidade, e outras vezes estimulando a angiogênese e a invasão tumoral (LONGO *et al.*, 2002).

A neovascularização é usualmente um pré-requisito para a progressão tumoral. Mas existem alguns tumores que não requerem neovascularização, entre eles está o astrocitoma. Ele cresce às margens dos vasos, porém, evoluindo de grau II para grau IV, as células se tornam necróticas e hipóxicas, gerando novos vasos. Tumores cerebrais pilocíticos grau I são angiogênicos, no entanto, seu crescimento é lento e não produzem metástases. Tumores agressivos, como o condrossarcoma, têm baixa densidade vascular. Outros tumores possuem densidade vascular muito escassa. Esses tumores requerem menos oxigênio e excretam menos metabólitos. A baixa atividade angiogênica não significa que não esteja recebendo adequadamente oxigênio e nutrientes. Caso exista déficit de oxigenação, haverá necrose, hipóxia e angiogênese (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

Alguns tumores requerem para angiogênese o recrutamento de células precursoras endoteliais provenientes da medula óssea. As pesquisas estão concentradas em diferentes

propriedades de diferentes populações EPCs e seu papel na angiogênese (BERGERS; BENJAMIN, 2003; SIEVEKING *et al.*, 2008).

Atualmente, todo esse conhecimento da fisiologia e fisiopatologia da angiogênese é utilizado em pesquisas na procura tanto de estimuladores quanto de inibidores de angiogênese, objetivando desenvolvimento de novos fármacos para o controle de doenças isquêmicas, doenças inflamatórias e principalmente para tratamento de neoplasias malignas.

A utilização de protocolos com agentes antiangiogênicos e fármacos citostáticos estão sendo implementadas. Estudos experimentais e clínicos tem demonstrado que a utilização de inibidores de angiogênese em tratamentos de tumores malignos, melhora a efetividade da radioterapia e de agentes citotóxicos na redução da massa tumoral, por aumentar a tensão de oxigênio, e aumentar a permeabilidade das drogas. Inibidores de angiogênese reduzem a pressão intersticial dos fluidos e favorece a difusão tecidual do quimioterápico. O bloqueio da angiogênese reduz a hipóxia intratumoral. O tratamento com anti VEGF aumenta a permeabilidade do vaso permitindo o extravasamento de agentes citotóxicos e bloqueia o estímulo autócrino e parácrino para a formação de novos vasos (JAIN, 2003; GASPARINI *et al.*, 2005).

1. 4 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-hidroxiutil] 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 60 e início da década de 70, que foram sintetizados carcinógenos, órgão específico para bexiga de roedores: o BBN (N- butil-N- [4-hidroxiutil] 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 metabolito 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 metabolito do BBN eliminado pela urina é o butil (3-carboxipropil) nitrosamina (BCPN), que resulta da oxidação, por enzimas hepáticas (alcool/aldeído desidrogenase) do radical álcool do BBN para um radical carboxil (HASHIMOTO, 1974). Por α hidroxilação BCPN e BBN são quimicamente clivados em seu correspondente alkilcarbono 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-Uridinodofosfato glucoronosil transferase), que vão conjugar carcinógenos (neste caso específico, o BBN) e cofatores (glutathione e ácido glicurônico),

gerando a BBN glucoronide. 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 - ditiolé 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 reposta 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-ditiolé-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 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-hidroxiopropil) nitrosamina (BHPN), propil (4-hidroxybutil) nitrosamina (PHBN), butil (2-hidroxietyl) 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, pode 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 80 (ITO; FUKUSHIMA, 1989; FUKUSHIMA, 1991), com recentes modificações (OLIVEIRA *et al.*, 2006), (Quadro 1).

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: sódio e 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 ions administrados, ou metabólitos, podem alterar a configuração e 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).

| 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 Erirtorbato de sódio Fenobarbital sódico Carbonato de potássio com ou sem ácido ascórbico |
| Químicos 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 | <i>DL</i> -triptofano <i>L</i> -leucina <i>L</i> -isoleucina |
| Outras drogas | Componentes da urina (fração I e II) Alopurinol Ácido dimetilarsínico |

QUADRO 1- Classificação de promotores de câncer de bexiga (ITO; FUKUSHIMA, 1989).

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 4 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 pelve renal podem chegar a ter 10 camadas. Entretanto, a papila renal é revestida por uma única camada de células cubóides (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 alantóide. No entanto, o trígono origina-se de ductos wolfiano mesodermis. 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 *Agency for Research on Câncer* (IARC, 1992). 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 lesões surgidas na bexiga pós 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 aumento do número de camadas a partir da membrana basal. Pode ser leve (4 a 6 camadas), moderada (7 a 10 camadas) ou severa (acima de 10 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 podem estar presentes.

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; AMIM; REUTER, 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 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 *et al.*, 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. 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, 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). Carcinomas de bexiga com o BBN em camundongos, o modelo 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 6).

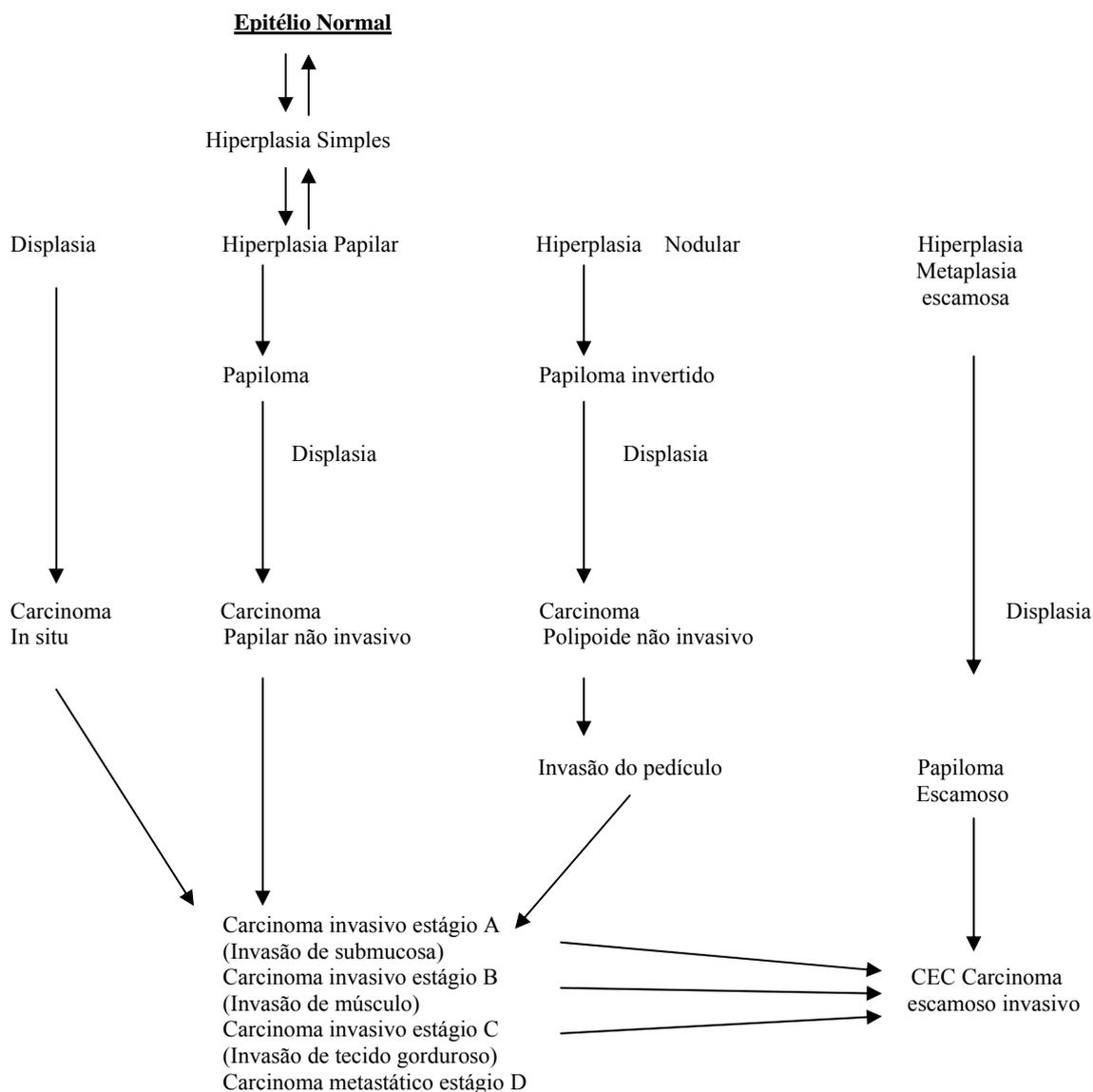


FIGURA 6 – Histogênese da carcinogênese de roedores (OYASU, 1999)

Existem vários parâmetros que podem afetar a carcinogênese de bexiga, como dieta, fluidos, pH urinário, volume osmolar, cations, 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... 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... 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 localizam 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... 1995)

Esses conceitos são muito importantes, como foi dito anteriormente, pois alguns centros de pesquisas têm utilizado o BBN por 4 a 8 semanas, e após esse período, utilizam o uracil, constituindo modelos mais econômicos para estudo da carcinogênese vesical. E 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 comparam carcinomas de bexigas invasivos em humanos (WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008) (Figura 7).

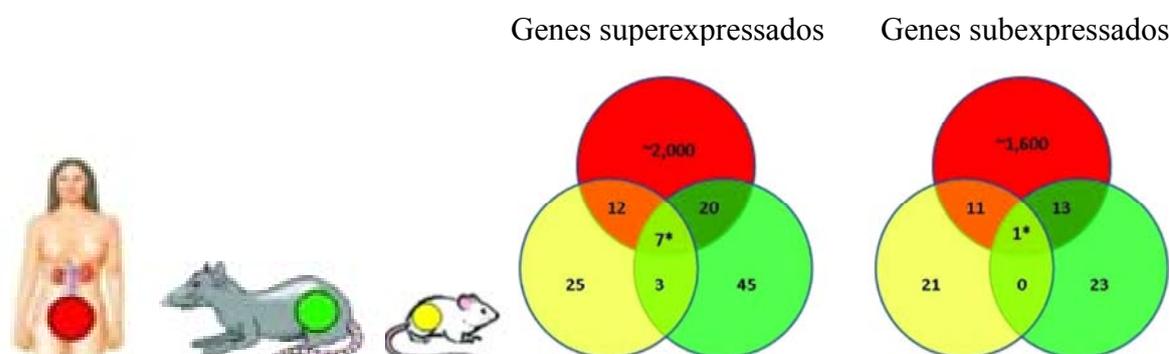


FIGURA 7: Genes homólogos de genes humanos em ratos e camundongos submetidos à carcinogênese de bexiga pelo BBN. A concordância aumenta entre genes de roedores e genes humanos com a invasão do câncer de bexiga. *Na região central de interseção observam-se oito genes homólogos humanos tanto em ratos como em camundongos (adaptado de 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 conhecidos 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.

1. 5 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 5 km, em torno da colmeia, em se tratando de *Apis mellífera* (MENEZES, 2005; SALATINO *et al.*, 2005). A cor da própolis possui variações, sempre relacionadas com a vegetação, a de entorno à colméia, 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 onde o clima é tropical, onde a vegetação tem maior abundância em espécies, quando comparadas a outras em que o clima é temperado (BANCOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; 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 microorganismos, 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 Sverdlovsk, 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 70, 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 (MARCUCI, 2006).

Até a década de 90, os trabalhos publicados sobre a utilização da própolis em geral eram provenientes de países na 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; CHINOU, 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; MELLIU; ESTRATIS; CHINOU, 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; FERRERES; VIGUERA, 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; IVANOVSKA *et al.*, 1995; 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; ÇEKIÇ, 1999); inibição de angiogênese tumoral (AHN *et al.*, 2007; JUNG *et al.*, 2007; KUNIMASA *et al.*, 2009).

Em 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 distintas: 5 na região sul, 6 na região nordeste, 1 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 aparecem 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 |

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 4 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 (Figura 8).



FIGURA 8 - *Baccharis dracunculifolia* e *Apis mellifera*:
Disponível em: <http://revista.fapemig.br/materia.php?id=157>.

Existem duas plantas, uma feminina e outra masculina, e apesar de diferenças entre os compostos químicos exalados, elas são visitadas igualmente pelas abelhas (Figura 9A-B).



FIGURA 9 –*Baccharis dracunculifolia*: A- planta masculina B- planta feminina

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 espectometria 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* e a maioria delas é nativa do continente sul-americano; destas, 120 espécies são brasileiras. 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 grisebacchi* na Argentina e outras *Baccharis ssp* no Brasil. A própolis brasileira é internacionalmente conhecida como própolis verde. O nome própolis verde 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.

1. 6 A 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 alcóolica.

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 a 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 3 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 150 ml de solução de *L*-lisina a 8%, na temperatura entre 50 e 60° centígrados e, a seguir, o produto acondicionado a 4° 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).

1. 7 Relevância e Justificativa

A riqueza e a complexidade da própolis verde observadas na sua tipificação e nas observações experimentais de seus efeitos biológicos experimentais *in vitro* e *in vivo*, a tornaram relevante como objeto de investigação farmacológica.

Por outro lado os dois focos que orientam esta tese são: a carcinogênese e angiogênese em tumores de bexiga.

As evidências epidemiológicas e clínicas apontam não apenas para um aumento progressivo da incidência desta doença no homem, mas também para a importância dos fatores ambientais a ela relacionados.

A contaminação do ar, da água e dos alimentos com carcinógenos cotidianamente leva a refletir sobre a importância da quimioprevenção da carcinogênese, e é nesse sentido e no sentido terapêutico que a pesquisa caminha, já que o câncer de bexiga é uma doença de alta prevalência com alta recorrência. Em se falando de tratamento, a angiogênese revolucionou a abordagem terapêutica em muitas doenças, tornou-se um alvo para as pesquisas no tratamento contra câncer com resultados promissores. Portanto prevenção e tratamento são relevantes e estão nos objetivos desta tese.

A própolis brasileira é alvo do interesse de pesquisadores em vários países, os quais não apenas a estudam, mas sintetizam seus compostos transformando-os em patentes, aprisionando o conhecimento e nos devolvendo a preço de ouro os seus frutos, tornando-nos reféns da exploração econômica de nossos próprios recursos naturais, fato este que se repete em um círculo vicioso histórico. Trata-se o seu estudo, portanto de relevância não apenas científica, mas de natureza política, econômica e social.

É importante que não apenas abracemos a nossa biodiversidade, mas avancemos no seu conhecimento e a coloquemos a serviço da saúde e do bem estar do homem, que deveria ser o princípio, meio e fim de todo avanço técnico e científico.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da própolis verde na angiogênese e carcinogênese de bexiga induzida pelo BBN em ratas Wistar.

2.2 Objetivos específicos:

Extrair e tipificar a própolis verde.

Implementar o modelo de carcinogênese em bexiga de rata induzida por BBN.

Avaliar o efeito da própolis verde na carcinogênese de bexiga induzida por BBN.

Avaliar o efeito da própolis verde na angiogênese de carcinomas de bexiga induzidas pelo BBN.

Investigar a influência da L-lisina na carcinogênese de bexiga induzida pelo BBN.

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

O projeto de pesquisa foi desenvolvido conforme o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, em 23 de maio de 2006 (Protocolo número 03/06 - anexo A), estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1 Os animais:

Foram utilizadas 125 ratas albinas da linhagem wistar, classe mammália, ordem rodentia, família murídea, gênero *Rattus*, espécie *novergicus*, com 5 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 16 cm, alojados em número de 5 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 Biotec “9301”- composição química – anexo C) 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.

3.2 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 (IARC - *International Agency for Reseach on Câncer*- 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 antissepsia 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 (Figura 10).



FIGURA 10 - Pictogramas para prevenção de contaminação humana e ambiental

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 gazes - ADVANTAGE 200 CA8558 MSA, com filtros GME-H CL-1 218157 MSA, óculos protetor, 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, pro-pés e óculos protetores, e foram acompanhados diretamente e diariamente em suas atividades pelo pesquisador.

O volume de água ingerido por cada grupo de cinco animais foi avaliado previamente por um grupo piloto paralelo, e projetado para uma mamadeira de polipropileno de 250 ml 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 (IARC, 1982), e só então despejada em esgoto comum. Ao final de 14 semanas, as mamadeiras e os bicos foram encaminhados para a 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 2 horas e lavadas 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 utilizaram 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 das gaiola e 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.

3. 3 As substâncias utilizadas

3. 3 1 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 10 gotas de solução de Tween 80, em vidro âmbar de 1 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, pró-pés, luvas de látex e luvas de borrachas, obedecendo a rigoroso protocolo elaborado pelo pesquisador (Apêndice A), segundo normas internacionais estabelecidas pela OMS para manipulação de nitrosaminas. Baseados nessas recomendações e no MSDS (*Material Safety Data Sheet* - Anexo D) 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 IARC (1979;1982).

3.3.2 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 (Apêndice A).

A solução de soda cáustica e alumínio (IARC, 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.

3.3.3 Celecoxibe

Celebra 200 mg do laboratório Pfizer.

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

3.3.4 L - lisina

Aminoácido com origem e procedência da Alemanha L-lisina cloridrato
Lote 040309 (certificado de qualidade em Anexo E).

Fórmula: C₆ H₁₄ N₂ O₂. HCL PM 182,65

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

Preparada em solução de H₂O destilada a 8% para extração de própolis. Administrada nas doses de 150 e 300 mg/kg/peso dia.

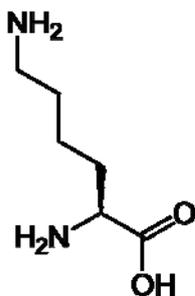


FIGURA 11 - Estrutura química da L-lisina

3.4 A extração da própolis verde em *L*-lisina:

A Própolis verde bruta, embalada a vácuo (Figura 13 A), 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 12 B e 13).



FIGURA 12 – A - Própolis verde *in natura* a vácuo; B - *Baccharis dracunculifolia*, coletada em Passa Quatro, Minas Gerais (MG) e enviada para Fortaleza com a própolis.



FIGURA 13 - Vegetação em torno da colmeia em Passa Quatro (MG). Arbustos de *Baccharis dracunculifolia*, entre outros.

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

A análise físico-química da própolis fornecida pelo Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté foi enviada para comprovar a qualidade do produto (Anexo B).

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 – (Anexo F) (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 vem estudando 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 1500 ml foi aquecida em “banho-maria” a uma temperatura entre 51 e 60°. A essa solução foram acrescentadas 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 a 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 acondicionada em *eppendorfs*, e estes colocados em frascos vedados e sob refrigeração (Figuras 14 e 15).



FIGURA 14 -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

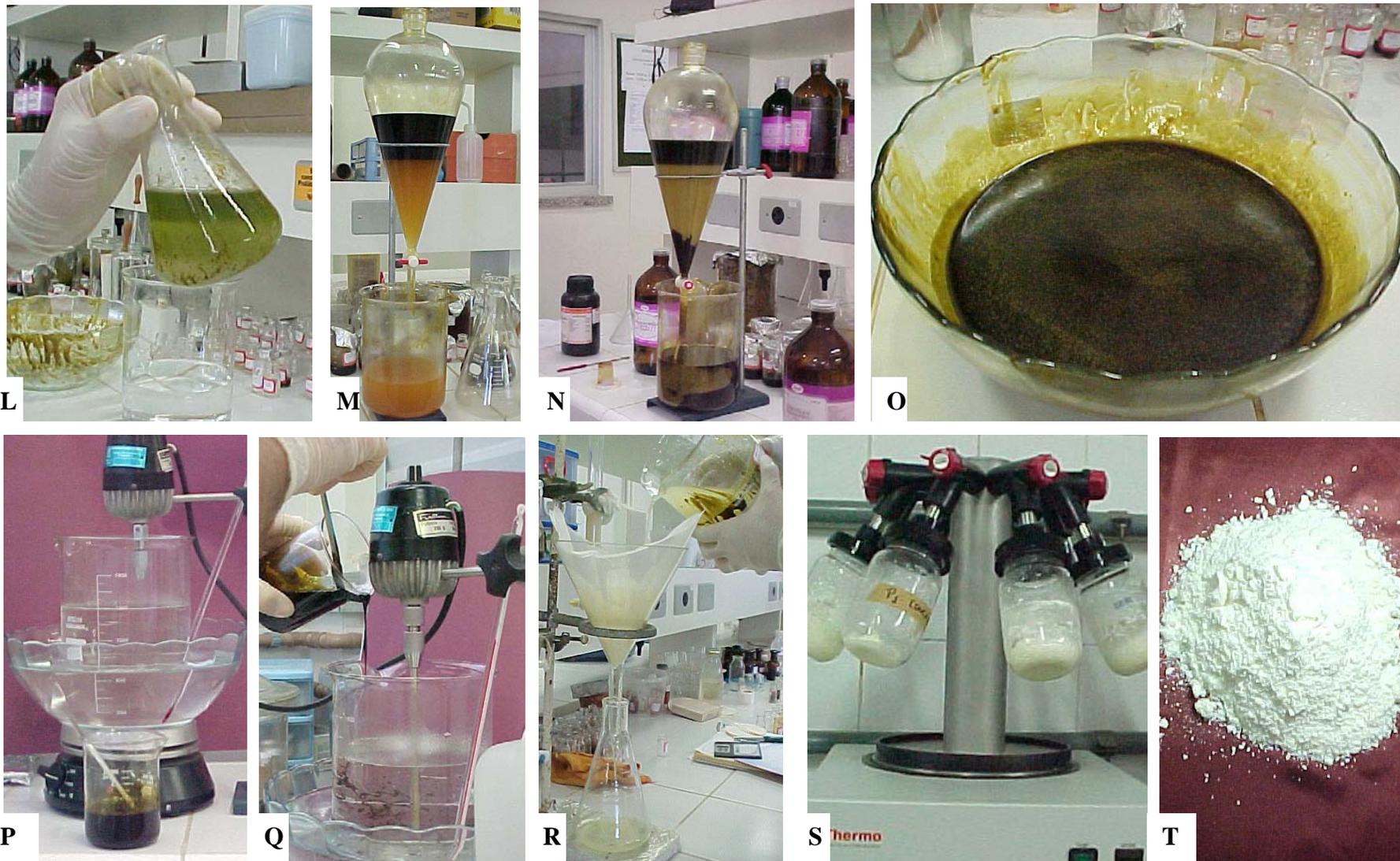


FIGURA 15 - Extração da própolis WSDP continuação: M e N - Extração em éter etílico; O- Concentração e evaporação do extrato de própolis; P, Q e R - Extração em L-lisina ; S – liofilização; T- Própolis liofilizada

3. 5 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 1 ml/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 pela professora Maria Cristina Marcucci da Universidade Bandeirante (UNIBAN), na cidade de Campinas SP. Paralelamente, foram isoladas outras substancias da própolis no Laboratório d e Química Orgânica da UFC.

3. 6 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 1.0 ml de etanol e adicionadas a uma solução etanólica de DPPH (1,0 ml), na concentração de 60 μM ; adicionou-se em uma cubeta cerca de 1ml de DPPH, 1ml de Etanol; testaram-se substâncias em diferentes concentrações. Foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 520 nm 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, utilizou-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 $\%AA = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right) \cdot 100$.

3. 7 Delineamento do experimento:

Foram utilizadas 125 ratas com 5 semanas de idade, distribuídas em 14 grupos (Tabela 3), recebendo:

No grupo I (n = 10), própolis em administração intragástrica diária e em dose única de 150 mg/kg por 30 dias (7/7 dias). A partir do 1º dia após os trinta dias, BBN a 0,05%, veiculado em água de beber *ad libitum*, por 14 semanas. Durante a administração do BBN, foi continuada a administração de própolis, na mesma dosagem, porém, 6 dias na semana (6/7), com repouso no sétimo dia, até 40ª semana pós BBN.

No grupo IIA (n = 7), BBN a 0,05%, veiculado em água de beber, *ad libitum*, por 14 semanas, simultaneamente, injeção de própolis subcutânea, diluída em 1 ml de água destilada estéril, na dose de 150 mg/kg peso, em região de dorso cervical, 6 dias por semana (6/7). Ao final das 14 semanas, os animais continuaram recebendo própolis até a 40ª s.

No grupo IIB (n = 6), BBN a 0,05%, veiculado em água de beber, por 14 semanas, simultaneamente, injeção de 1 ml de água destilada estéril, em região de dorso cervical, 6 dias por semana (6/7). Ao final das 14 semanas, os animais continuaram recebendo água destilada, até a 40ª s.

Grupo III (n = 10), BBN a 0,05%, veiculado em água de beber, por 14 semanas, e, simultaneamente, própolis, por via intragástrica, na dose de 150 mg/kg peso, 6 dias por semana (6/7). Ao final das 14 semanas, os animais continuaram recebendo própolis, até a 40ª s.

No grupo VIII (n = 10), BBN a 0,05%, veiculado em água de beber, por 14 semanas, e, simultaneamente, por via intragástrica, própolis na dose de 150 mg/kg peso, 6 dias por semana (6/7). Ao final das 14 semanas, os animais continuaram recebendo própolis, até a 40^as.

Os Grupos IV, V, VI, VII, constituídos, inicialmente, por 10 animais em cada grupo, e o grupo IX, com 18 animais, perfazendo um total de 58 animais, receberam BBN a 0,05%, veiculado em água de beber, por 14 semanas. Foram submetidos à ultrassonografia de bexiga na 31^a semana, após início do BBN, para avaliação de tumoração intravesical. Baseando-se no valor do maior diâmetro medido pelo cáliber na imagem, intravesical, as imagens foram classificadas em: sem imagem tumoral, pequena (de 0,1 a 2,0 mm), média (de 2,1 a 3,0 mm) e grande imagem tumoral (> 3,1 mm). Após essa classificação, os animais foram estratificados em 4 grupos (K, L, M e N), de forma que estes grupos tivessem a mesma probabilidade de receberem animais sem imagens de tumores e com imagens de tumores pequenos, médios e grandes (Tabelas 2 e 3; Figura 16).

Grupo K (n = 13): BBN a 0,05%, por 14 semanas, e água *ad libitum* até a 40^a semana.

Grupo L (n = 13): BBN a 0,05%, por 14 semanas. Na 32^a semana pós BBN, *L*-lisina, via intragástrica, na dose única diária de 300 mg/kg peso, sem interrupção (7/7 dias) até a 40^a semana.

Grupo M (n = 12): BBN a 0,05%, por 14 semanas. Na 32^a semana pós BBN, celocoxibe, via intragástrica, na dose única diária de 30 mg/kg peso (7/7 dias), até a 40^a semana.

Grupo N (n = 13): BBN a 0,05%, por 14 semanas. Na 32^a semana pós BBN, recebeu Própolis, via intragástrica, na dose única, diária de 300 mg/kg peso (7/7 dias, até a 40^a semana.

Grupo X (n = 6): BBN a 0,05%, por 14 semanas, simultaneamente, recebeu *L*-lisina, via intragástrica, na dose única diária de 150 mg/kg peso, 6 dias por semana (6/7), com repouso no sétimo dia. Ao final das 14 semanas, os animais continuaram recebendo *L*-lisina, até a 40^a semana.

Grupo XI (n = 6): Própolis em administração intragástrica diária, na dose única de 150 mg/kg peso por 41 semanas, 6 dias por semana (6/7), até a 40^a semana.

Grupo XII (n = 6): *L*-lisina em administração intragástrica diária, na dose única de 150 mg/kg peso por 40 semanas, 6 dias por semana (6/7), até a 40^a semana.

Grupo XIII (n = 6): Água destilada em administração intragástrica diária, na dose de 1 ml por 40 semanas, 6 dias por semana (6/7), até a 40ª semana. Os animais foram submetidos à eutanásia na 41ª semana.

Os critérios de exclusão para avaliação de angiogênese foram o não desenvolvimento de carcinomas, carcinomas que apresentavam necrose extensa, autólise e com dimensões inferiores a 0,5 cm de diâmetro. Foram efetivamente analisados quanto à densidade microvascular 31 ratos: 6 animais do grupo K e 5 animais para cada grupo L, M, N, X e III.

Os grupos VII e VIII, que previamente à 30ª semana seriam utilizados em curvas de mortalidade, foram inviabilizados, devido a momentâneo surto de broncopneumonia ocorrido nesse período (Tabela 2).

Dessa forma, os animais do grupo VIII semelhantes aos do grupo III foram reunidos formando um único grupo, denominado de grupo III+VIII, posteriormente grupo III (Tabela 3; Figura 16).

O grupo VII foi reunido aos grupos para estudo de angiogênese.

O experimento teve a duração de 45 semanas, com eutanásia na 41ª semana pós BBN.

Os animais foram pesados a cada 15 dias.

Foi realizada a curva de variação temporal de massa corporal. (A variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, calculada nos diversos grupos de tratamento em função da massa corporal verificada no início do estudo, conforme a seguinte

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

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

TABELA 2 - Desenho experimental inicial (1ª a 31ª semana)

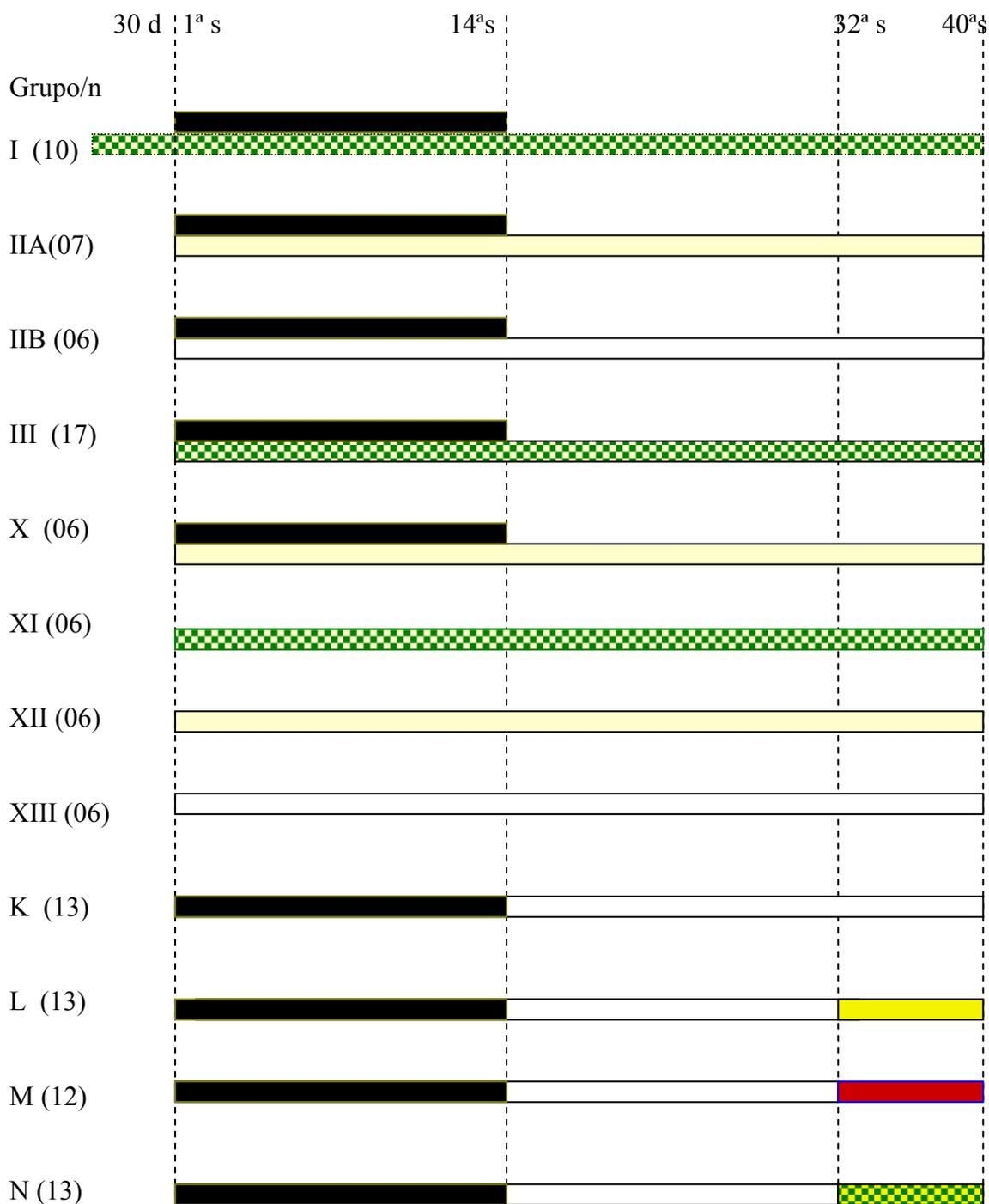
| Idade: | | 5S a 17S | 18S | 35S | 36S | 44 S | 45 semanas | |
|-------------|---------|----------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|
| Experimento | Grupo/N | 30 dias | 1ª a 14ª S | 15ª S | 31ª S | 32ª S | 40ª S | 41ª S |
| | | I | 10 | P | BBN + P | P | P | P |
| IIA | 07 | | BBN + P sc | P sc | P sc | P sc | P sc | EUT |
| IIB | 06 | | BBN+ H ₂ O sc | EUT |
| III | 10 | | BBN + P | P | P | P | P | EUT |
| IV | 10 | | BBN | ... | ... | ... | ... | EUT |
| V | 10 | | BBN | ... | ... | ... | ... | EUT |
| VI | 10 | | BBN | ... | ... | ... | ... | EUT |
| VII | 10 | | BBN | ... | ... | ... | ... | CM |
| VIII | 10 | | BBN + P | P | P | P | P | CM |
| IX | 18 | | BBN | ... | ... | ... | ... | EUT |
| X | 06 | | BBN+Li | Li | Li | Li | Li | EUT |
| XI | 06 | | P | P | P | P | P | EUT |
| XII | 06 | | Li | Li | Li | Li | Li | EUT |
| XIII | 06 | | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | EUT |
| TOTAL | | 125 | | | | | | |

P- própolis; N- Número; S- Semana; BBN- Carcinógeno; Li- L Lisina; H₂O- Água; EUT- Eutanásia; sc- Subcutânea; CM- Curva de mortalidade.

TABELA 3: Desenho experimental final (32^a a 40^a)

| Idade: | | 5S a 17S | 18S | 35S | 36S | 44 S | 45 semanas | |
|-------------|---------|----------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Experimento | Grupo/N | 30 dias | 1 ^a a 14 ^a S | 15 ^a S | 31 ^a S | 32 ^a S | 40 ^a S | 41 ^a S |
| | | I | 10 | P | BBN + P | P | P | P |
| IIA | 07 | | BBN + P sc | P sc | P sc | P sc | P sc | EUT |
| IIB | 06 | | BBN+ H ₂ O sc | H ₂ O sc | H ₂ O sc | H ₂ O sc | H ₂ O sc | EUT |
| III | 17 | | BBN + P | P | P | P | P | EUT |
| K | 13 | | BBN | ... | ... | ... | ... | EUT |
| L | 13 | | BBN | ... | ... | LiLi | LiLi | EUT |
| M | 12 | | BBN | ... | ... | Cel | Cel | EUT |
| N | 13 | | BBN | ... | ... | PP | PP | EUT |
| X | 06 | | BBN+Li | Li | Li | Li | Li | EUT |
| XI | 06 | | P | P | P | P | P | EUT |
| XII | 06 | | Li | Li | Li | Li | Li | EUT |
| XIII | 06 | | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | H ₂ O | EUT |
| TOTAL | | 115 | | | | | | |

P- própolis; N- Número; S- Semana; BBN- Carcinógeno; Li- L- Lisina; H₂O- Água; EUT- Eutanásia; sc- Subcutânea; CM- Curva de mortalidade. LiLi – Dupla dose de L-lisina; Cel – Celecoxibe; PP- Dupla dose de própolis.



Própolis (150 mg/kg/peso) L-lisina (150 mg/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

FIGURA 16 – Delineamento do experimento

3. 8 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 semana e na 40ª semana, após o início do carcinógeno, sob anestesia peritonial com ketamina e xilazina, nas doses de 80mg/kg e 8 mg/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 vaginal, fazendo uma angulação cefálica a 6 mm 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 protegida com sacos plásticos sob gel (Figura 17). Todos os exames foram fotografados e gravados em CD.

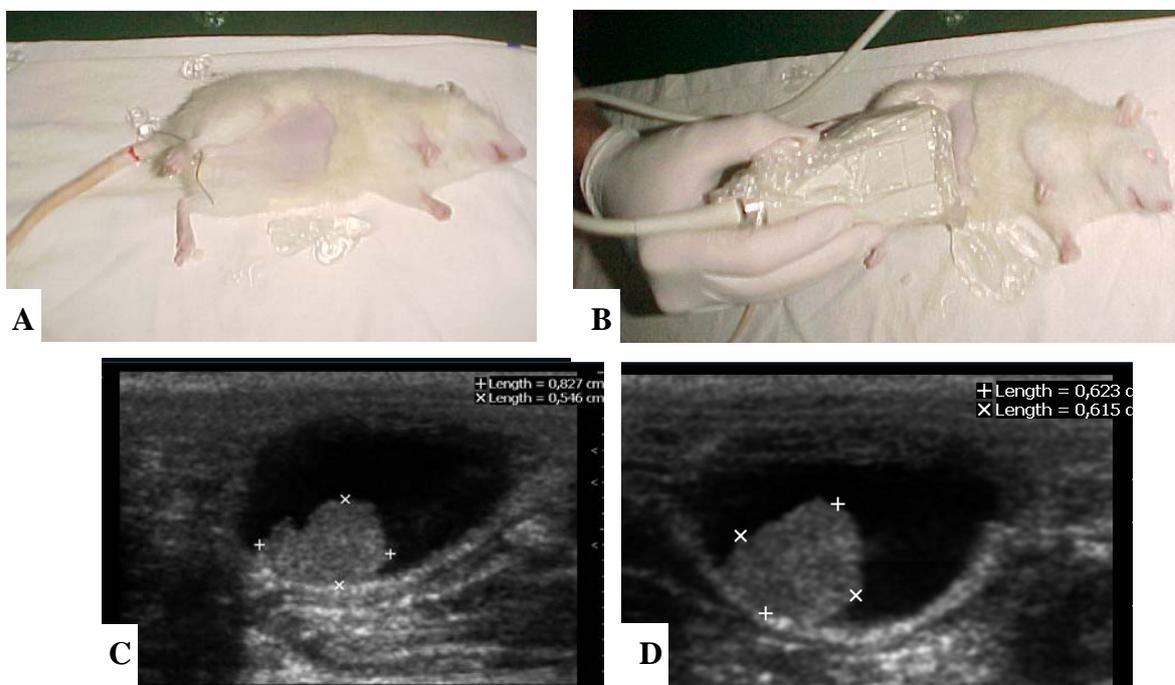


FIGURA 17 –Ultrassonografia- A- Rata anestesiada preparada para ultrassonografia de bexiga B – Sonda linear no abdome. C- Ultrassonografia: imagem vegetante tumoral projetando-se para o interior da bexiga cheia (janela acústica vesical). Medidas de seus maiores diâmetros (cortes transversal e sagital) Grupo M - Rato 3 - 40 semanas.

3. 9 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 8 mg/kg peso, respectivamente. Foi realizada incisão abdominal longitudinal mediana xifopubiana, interessando pele, subcutâneo e musculatura, 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. Utilizando-se seringa e agulha, foi então puncionado ao nível da bifurcação das ilíacas com aspiração de 3 ml de sangue arterial para avaliação laboratorial (Figura 18 A). A seguir a bexiga foi então seccionada ao nível da ligadura e insuflada com formol a 10%. Foi administrada uma dose a mais de ketamina e xilazina para eutanásia, seguida de necropsia com retirada de todos os órgãos, com fixação em formol a 10%. O fêmur foi retirado bilateralmente para avaliação de genotoxicidade (Figura 18 B).

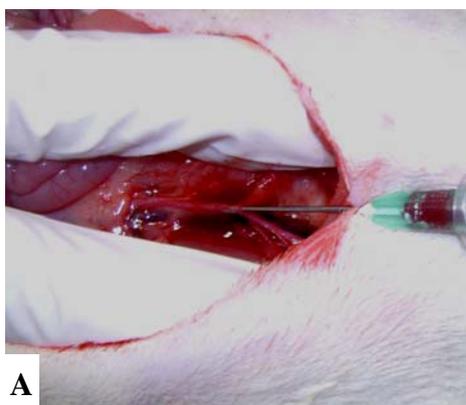


FIGURA 18 - A- aspiração de sangue arterial de aorta abdominal B- aspiração de medula óssea de fêmur

3. 10 Estudo da macroscópia da bexiga fixada em Formol:

A bexiga foi insuflada com formol a 10%, com ligadura de uretra e ureter bilateralmente. Dessa forma, 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 a contra luz 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 em aumentos de 10, 16, 25 e 40 vezes (Figura 19 CD), mapeadas, desenhadas, identificadas (figura 20) e incluídas em arquivos encadernados.

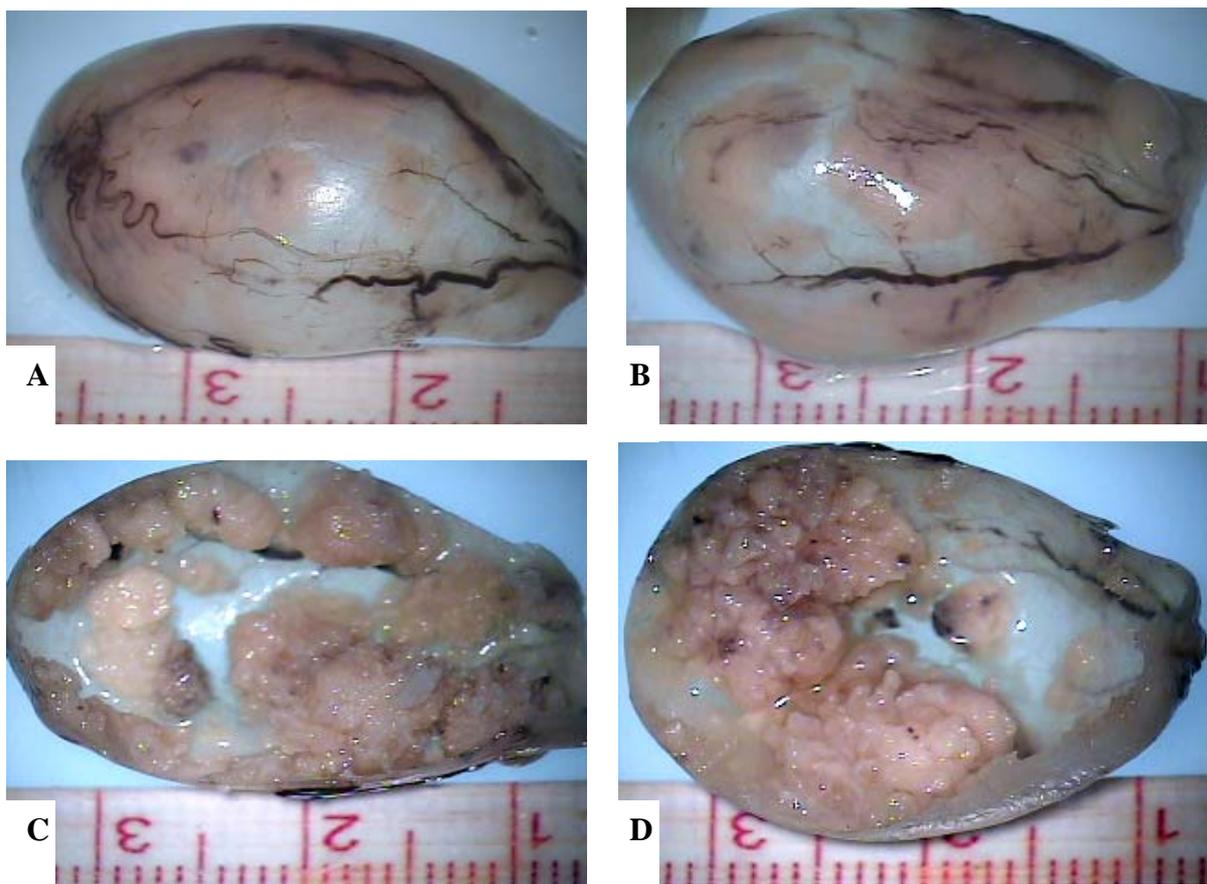


FIGURA - 19 - Exame da bexiga: A e B -Bexiga fixada em formol a 10% seccionada em plano coronal, parede ventral e dorsal . Na superfície externa (A e B), notam-se vasos proeminentes calibrosos, alguns espiralados, e na luz vesical; C e D- observam-se múltiplas lesões papilares difusas, ocupando mais de 1/3 da parede - Grupo 19 - Rato 7.

3. 11 Avaliação da carcinogênese Análise histopatológica:

Bexiga, rins direito e esquerdo, ureteres, fígado, pâncreas, esôfago, pulmões, baço e coração fixados em formol a 10% foram clivados, examinados sob microscópio estereoscópico (DF VASCONCELLOS M90 VASCONCELLOS S.A.) com aumento de 40x, para avaliação de metástases e retirado fragmento para processamento histológico. Os cortes fixados foram então colocados em cassetes e introduzidos em cestos de processador automático histotécnico, seguindo as seguintes etapas de processamento: desidratados com álcool graduados a 70%, 95% (2 vezes), 100% (3 vezes), tempo mínimo de uma hora cada, diafanizados com xilol (3 vezes), mínimo de 2 horas cada, e impregnados em parafina fundida a 60^o (3 vezes), duas horas cada. Uma vez impregnados, os tecidos foram colocados em pequenos recipientes contendo parafina fundida. Em temperatura ambiente, a parafina solidificou-se formando blocos com tecido. Os blocos foram fixados em micrótomo rotativo convencional, para cortes na espessura de 5 µm. Esses cortes colocados em superfície de banho-maria (3 a 8^o) foram delicadamente distendidos e colocados sob lâmina e estes encaminhados para estufa a 60^oC. Após o período de 1 hora, os cortes foram então levados para desparafinar e hidratar na seguinte sequência: xilol 1, 2 e 3 (por 5, 2 e 1 minuto, respectivamente), seguido de álcool a 100%, 95% e 70% (1 minuto em cada mergulho), e por último lavado em água corrente por 2 minutos. O tecido, uma vez desparafinado e hidratado, foi então levado para corar pela hematoxilina de carazzi por 1 minuto, lavado em água, seguindo-se de eosina, a seguir montada com lamínula, uma gota de bálsamo do Canadá, sobre tecido corado.

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

Em virtude da característica multifocal das lesões vesicais, bem como pela 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), baseados em estudos prévios (BRYAN; COHEN, 1984; KUNZE; SCHAUER; SCHATT, 1976; OYASU *et al.*,1987).

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 4.

TABELA 4 - 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 |

Escore por lesão:

Hiperplasia simples:

Escore inicial 0

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

Atipias 0 a 3

Leve 1

Moderada 2

Severa 3

Escore máximo: Escore inicial (0) + número de camadas (3) + atipias (3) = 6

Hiperplasia papilar ou Hiperplasia nodular

Escore inicial 6

Escore fixo 3

Atipias 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 de partida 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 (pequena de outro tipo histológico)

Escamosa 3

Glandular 3

Escamosa/glandular 3

Pseudoglandular 3

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

Escamoso 3

Adenocarcinoma 3

Escamoso/adenocarcinoma 3

Escore total para carcinoma

| |
|----------------------------------------------------------------------------|
| Gradação histopatológica x Invasão x subtipo de carcinoma + escore inicial |
|----------------------------------------------------------------------------|

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

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.

Foram ainda realizados estudos de multiplicidade de CCT de bexiga (número de tumores por bexiga) com avaliação do número total de tumores por bexiga e por grupo, a invasão de cada um destes tumores e seu grau de atipia celular. O grau de atipia foi o mesmo utilizado para a obtenção dos índices de carcinogênese: baixo grau (1+) e alto grau (2+ e 3+). Os critérios para avaliação do grau de atipias estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5 - Critérios para avaliação do grau de atipia.

| Critérios para definir o grau de atipia | Baixo grau (1+) | Alto grau (2+ e 3+) |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Aumento de celularidade | Se apresentar qualquer dos critérios. | 2+ Se mais de 1 critério ou se todos de leve a moderada intensidade |
| Células gigantes | | |
| Hiper Cromasia nuclear | | |
| Nucléolo proeminente | | 3+ Se todos de intensidade acentuada |
| Pleomorfismo celular | | |
| Pleomorfismo nuclear | | |
| Presença de mitose atípica | | |

Critérios 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 do examinador.

3. 12 Avaliação da angiogênese tumoral por imunohistoquímica

Os critérios de exclusão para realização de imunohistoquímica foram: não desenvolvimento de carcinomas, carcinomas que apresentavam necrose extensa, autólise

intensa e com dimensões inferiores a 0,5 cm de diâmetro. Esses critérios foram estabelecidos em virtude da exigência de ótimo estado de conservação do material bem como da dificuldade de fixação de cortes muito pequenos sobre a lâmina quando submetidos à água fervente da panela de pressão. Foram efetivamente incluídos no estudo da densidade microvascular 31 ratos: 6 animais do grupo K e 5 animais para cada grupo L, M, N, X e III.

Lesões tumorais de bexigas dos grupos III, X, K, L, M e N, apresentando diagnóstico de carcinoma (previamente analisadas histopatologicamente), incluídas em parafina, foram cortadas na espessura de 5µm e colocadas sobre lâminas revestidas por organossilano (3- aminopropil-trietoxissilano - SIGMA). As lâminas foram então colocadas em estufa a 60° graus centígrados por 60 minutos, e logo após mergulhadas em xilol aquecido a 60° graus centígrados por 10 minutos, mergulhando-as em 3 gradientes de xilol PA, com mergulhos de 1 minuto cada, e por 3 gradientes de álcool PA e 1 gradiente de álcool a 80%, 1 minuto cada mergulho e então lavadas em água corrente por 10 minutos. Após desparafinar e hidratar, procedeu-se a recuperação antigênica. Esta foi realizada em solução de EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) a 1 mM, pH 8 sob ambiente de panela a vapor de pressão, por 8 minutos, deixando esfriar. A seguir foi então realizado bloqueio da peroxidase endógena utilizando H₂O₂ a 3% por 10 minutos. O tecido da lâmina foi delineado por caneta hidrofóbica e incubado com o anticorpo primário (PECAM-1 -M20- SC – 1506 - camundongo em cabra- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC), na diluição de 1:50, por *over night*, sob 4° em câmara úmida (Figura 21).

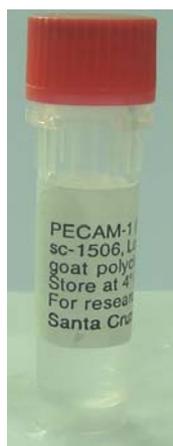


FIGURA 21 - frasco de 1 ml - PECAM-1®

Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) por 1 minuto e incubados com anticorpo secundário, biotilado anticabra, coelho e camundongo, produzido em porco (o reagente amarelo do *kit* streptavidina-biotina - Kit LSAB Sistem - HRP Dako) em câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente. A

seguir, as lâminas foram novamente lavadas em PBS, por 1 minuto cada, e, logo após, incubadas por mais 30 minutos com o reagente vermelho do mesmo *kit*, contendo streptovidina + peroxidase. A reação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorido) a 10% e peróxido de hidrogênio, sendo contracorada com hematoxilina de Carazzi. Procedeu-se à hidratação dos tecidos com mergulhos sucessivos em 3 gradientes de álcool PA e 1 gradiente de álcool a 80%, seguidos de 3 gradientes de xilol PA, por 1 minuto. Montada com laminula, sob gota de bálsamo do Canadá, as lâminas foram então analisadas ao microscópio sob aumento de 200 x, escolhendo-se 3 campos com maior concentração de vasos (*hot spot*) intratumorais próximos à invasão do tumor, excluindo os vasos com camada muscular.

Utilizou-se controle negativo omitindo-se o anticorpo primário, não sendo evidenciadas marcações. Foi utilizado como controle positivo tonsila humana e o rim de rato, com marcação bem definida em marrom escuro na parede dos vasos (Figuras 22 e 23)

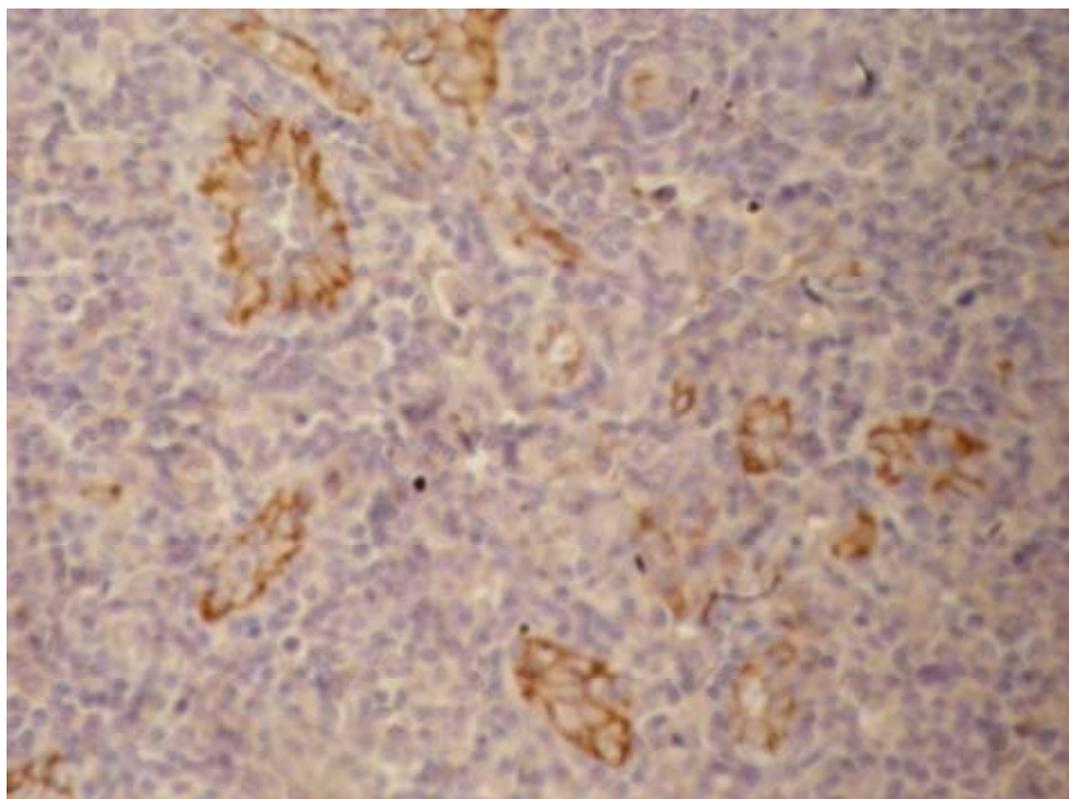


FIGURA 22 - Tonsila humana imunocorada, capilares marcados com anti- PECAM-1 (anti- CD 31) controle positivo-400x.

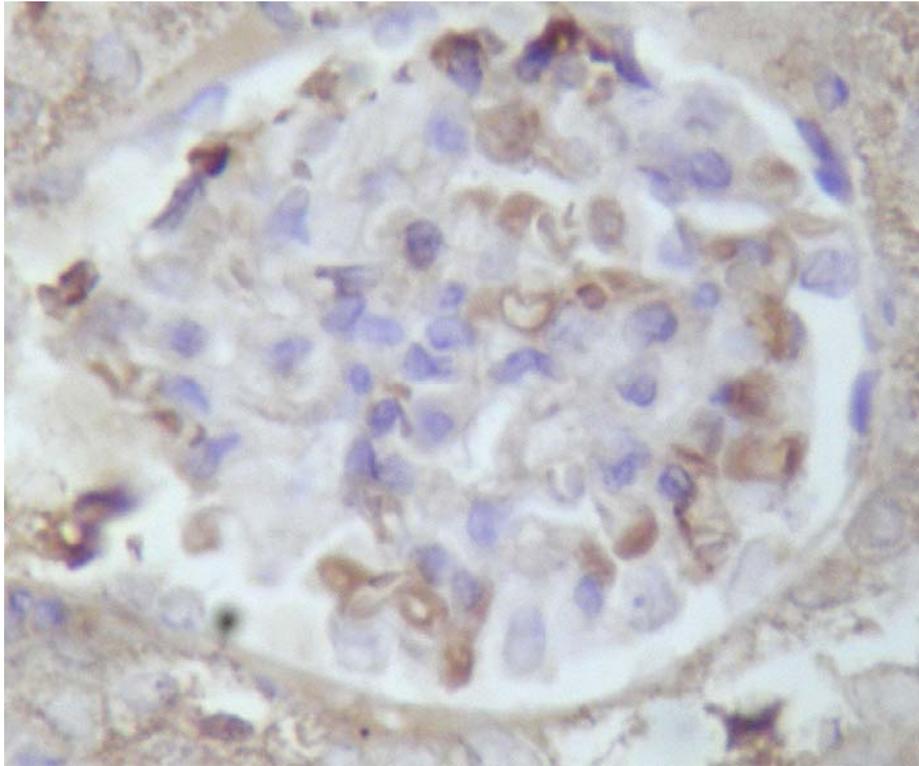


FIGURA 23 - Rim de rato imunocorado capilares glomerulares marcados por anti- PECAM-1 (anti-CD31) controle positivo – 400 x.

3. 13 Quantificação da angiogênese tumoral:

Imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz (BX4, OLYMPUS OPTICAL CO LTD - JAPAO) equipado com uma câmera digital (C7070 Wide Zoom, OLYMPUS IMAGING AMERICA INC- EUA). O procedimento compreendeu, inicialmente, uma varredura do tumor, utilizando o pequeno aumento (40 vezes), com a finalidade de identificar as zonas de maior densidade vascular (zonas quentes) (WEIDNER, 1995). Para cada tumor, selecionaram-se três zonas quentes. Em seguida, utilizando uma magnificação de 200 vezes, foram capturadas imagens digitais coloridas dos campos relativos às três zonas quentes escolhidas. As imagens foram armazenadas no formato Windows[®] Bitmap (BMP), com as dimensões de 512 x 384 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

As imagens foram analisadas pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas de interesse (microvasculatura), de acordo com a técnica de

coloração empregada. Esse procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente os vasos sanguíneos (separando-os dos demais componentes do preparado), tanto na imagem inteira como numa região de interesse definida pelo operador. Todavia, uma segmentação interativa era também disponibilizada, possibilitando, assim, a definição de novos parâmetros de segmentação, caso o pesquisador julgasse como inadequado o resultado do procedimento automático. Concluída a segmentação, o *software* realizava a determinação da densidade microvascular no campo estudado. Para tanto, calculava a densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela microvasculatura e a área total do campo analisado (Figura 24).

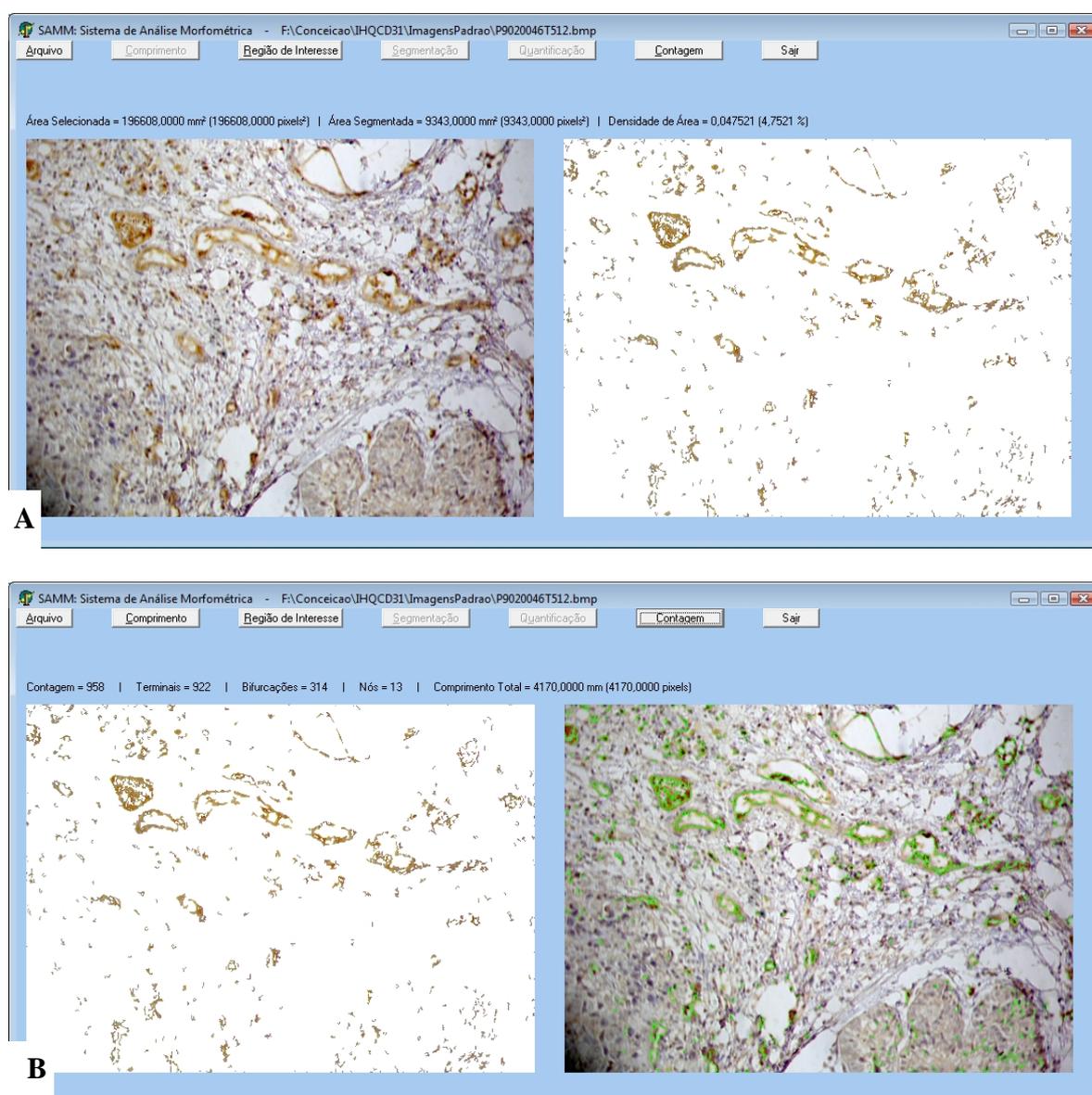


FIGURA 24 - Ambiente de SAMM - A - Identificação e segmentação de vasos e células imunocoradas com cálculo da densidade de área (densidade microvascular): Área total ocupada pela microvasculatura dividida pela área total do campo analisado. B – Comprimento total de vasos e células imunocoradas.

3.14 Análise estatística:

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos (dados não paramétricos). Comparações entre dois grupos foram feitas mediante o uso do teste t para variáveis não emparelhadas (dados paramétricos, observados no índice de carcinogênese) ou do teste U de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas, verificadas na multiplicidade de carcinomas). Comparações entre três ou mais grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), baseada em um fator (*one-way analysis of variance*), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para identificar diferenças entre os grupos dois a dois (dados paramétricos, observados no índice de carcinogênese e na densidade microvascular e na variação temporal da massa corporal), ou pelo teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas, encontradas na multiplicidade de carcinomas) (ARMITAGE; BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

Variáveis qualitativas nominais foram expressas como frequência absoluta e relativa, e analisadas pelo teste exato de Fisher ou pelo teste do qui-quadrado (dados observados na incidência de carcinomas, no grau de invasão, de atipias e de diferenciação e nos dados de subtipos de carcinomas). Variáveis qualitativas ordinais, por sua vez, foram expressas como mediana, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos, e analisados pelo teste U de Mann-Whitney (variáveis observadas na multiplicidade de carcinomas) (ARMITAGE; BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

A sobrevida dos animais foi analisada segundo o método de Kaplan Meir e a comparação entre os grupos efetuada através do teste de log-rank

Em todos os casos, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P bicaudal menor que 0,05.

O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4. RESULTADOS

4.1 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 evidenciou a presença do mais importante marcador da própolis verde, o artepillin C, com 13,60 mg/g de própolis. Foram também identificados 8 derivados do artepillin C na quantidade de 3,60 mg/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 25 e na Tabela 6:

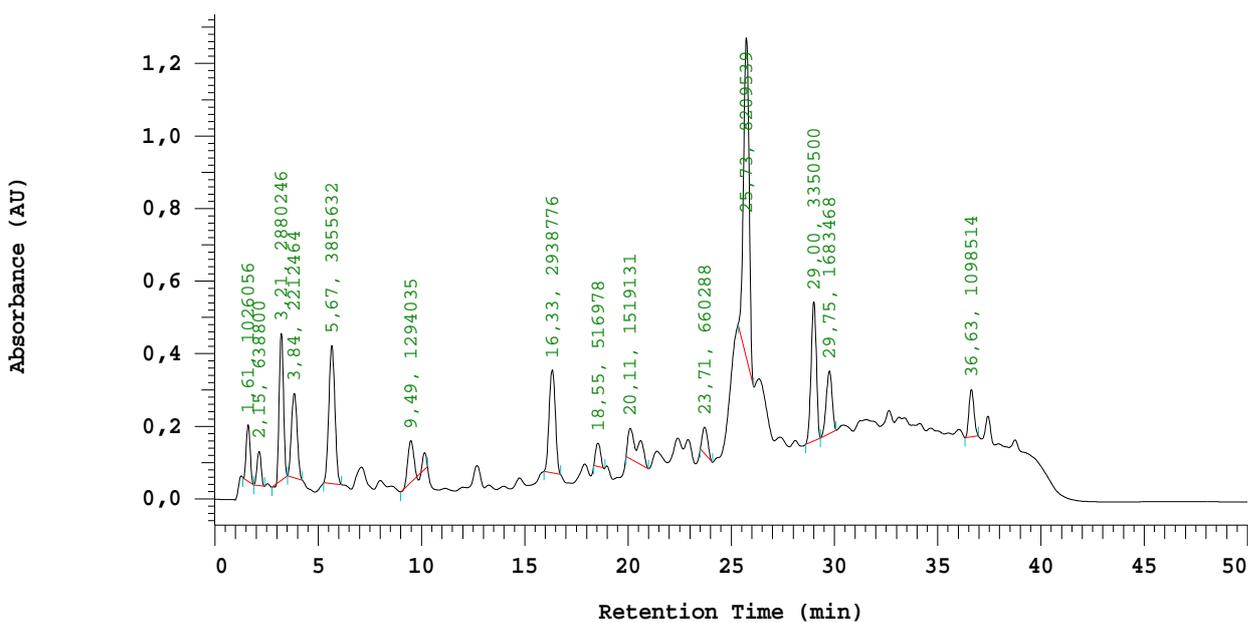


FIGURA 25 - Cromatograma (CLAE) da amostra de própolis bruta.

TABELA 6: 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-propenóico | 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-propenóico | 0,411 | 0,04 |
| Ácido E/Z comúncio | 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 |

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 26 e na Tabela 7.

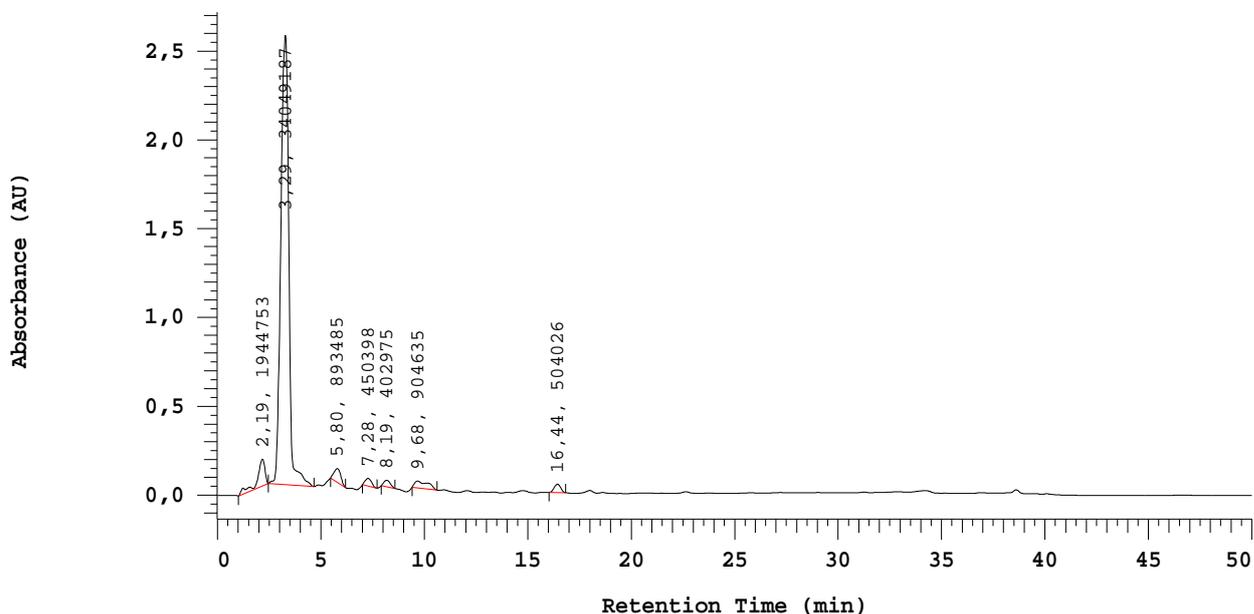


FIGURA 26- Cromatograma: (CLAE) de própolis liofilizada

TABELA 7 - 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 |

As estruturas químicas isoladas podem ser observadas na Figura 27:

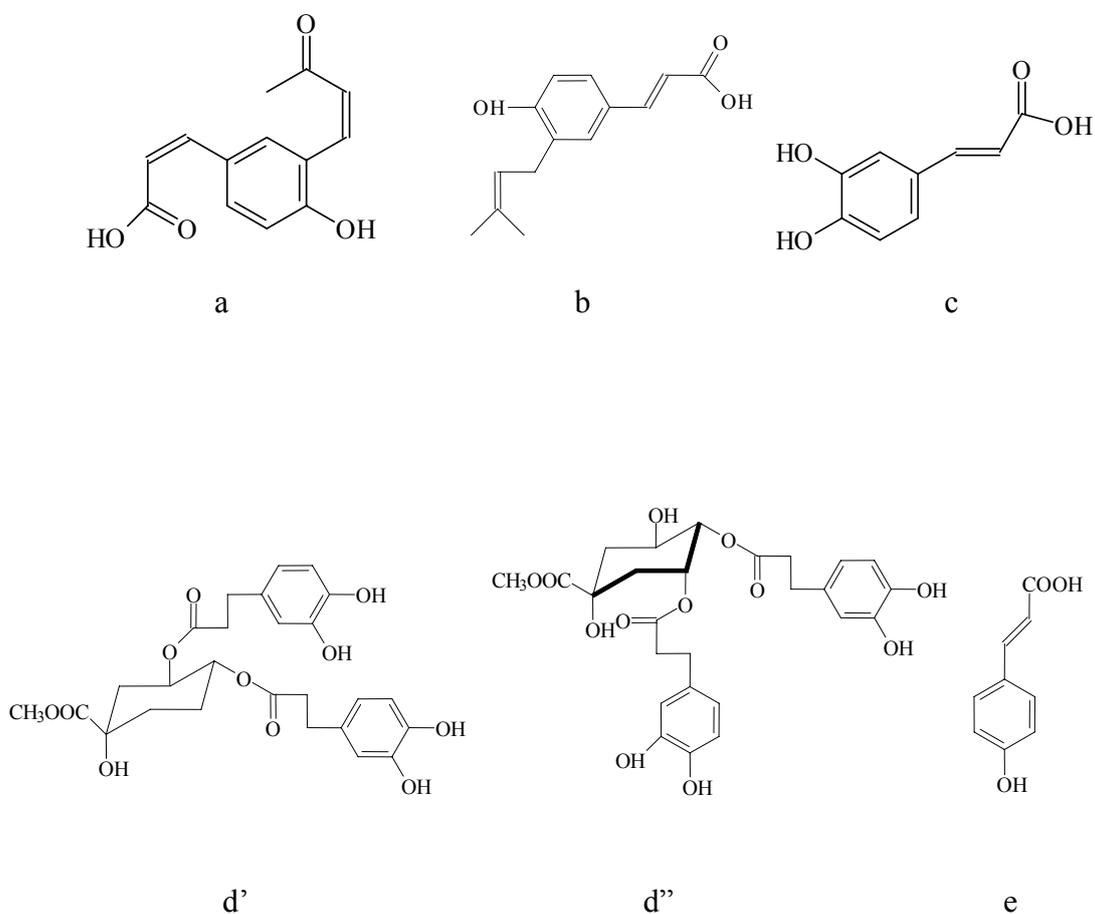


FIGURA 27 - Estruturas dos compostos isolados: a- Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrílico] ou propol, b - Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, c - Ácido cafeico d-Ácido cafeoilquínico - d'- 4' Ácido metil-4,5-di- o -cafeoilquínico ou d'' - Ácido metil-3,4 - di - o - cafeoilquinico ou ácido 3,4 - di -o- cafeoilquínico e- Ácido p-cumárico ou ácido 4- hidroxicinâmico.

Outros compostos foram isolados da própolis verde *in natura* no Laboratório de Química da UFC (Publicações - Apêndice H3)

4.2 Atividade antioxidante:

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 1000 ppm, obtiveram valores próximos ao da atividade antioxidante dos controles vitamina C e Trolox (Tabela 8; Figura 28; Apêndice H1).

TABELA 8 - Atividade antioxidante da própolis verde bruta e liofilizada comparada à atividade antioxidante da vitamina C e Trolox nas concentrações de 1000, 250 e 62,5 ppm.

| Tratamento | Concentração (ppm) | | | | | | IC ₅₀ (ppm) |
|------------|--------------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|------------------------|
| | 1000 | | 250 | | 62.5 | | |
| | Atividade | % | Atividade | % | Atividade | % | |
| 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-2 | 0.0170 | 95.06 | 0.0200 | 94.19 | 0.1180 | 65.70 | 28.62 |

EE prop - Extrato etanólico de própolis bruta

Liof-2 - Própolis liofilizada (*WSDP*)

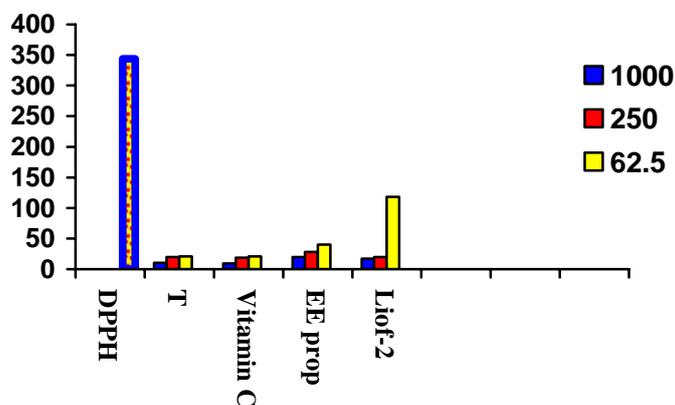


FIGURA 28 - Atividade antioxidante da própolis liofilizada (*WSDP*) e extrato etanólico da própolis *in natura*, ambas comparadas com o controle positivo Vitamina C e Trolox, nas concentrações de 1000, 250 e 62,5 ppm.

4.3 Resultados do experimento com os animais:

O protocolo de segurança pessoal e ambiental foi cumprido durante as 41 semanas. Não ocorreram acidentes de contaminação humana ou ambiental.

A tabela das médias de pesos a cada duas semanas, de todos os grupos, por 40 semanas, encontra-se no Apêndice B.

4.3.1 Variação temporal da massa corporal

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

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, I, IV, V, VI, VI, 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 29).

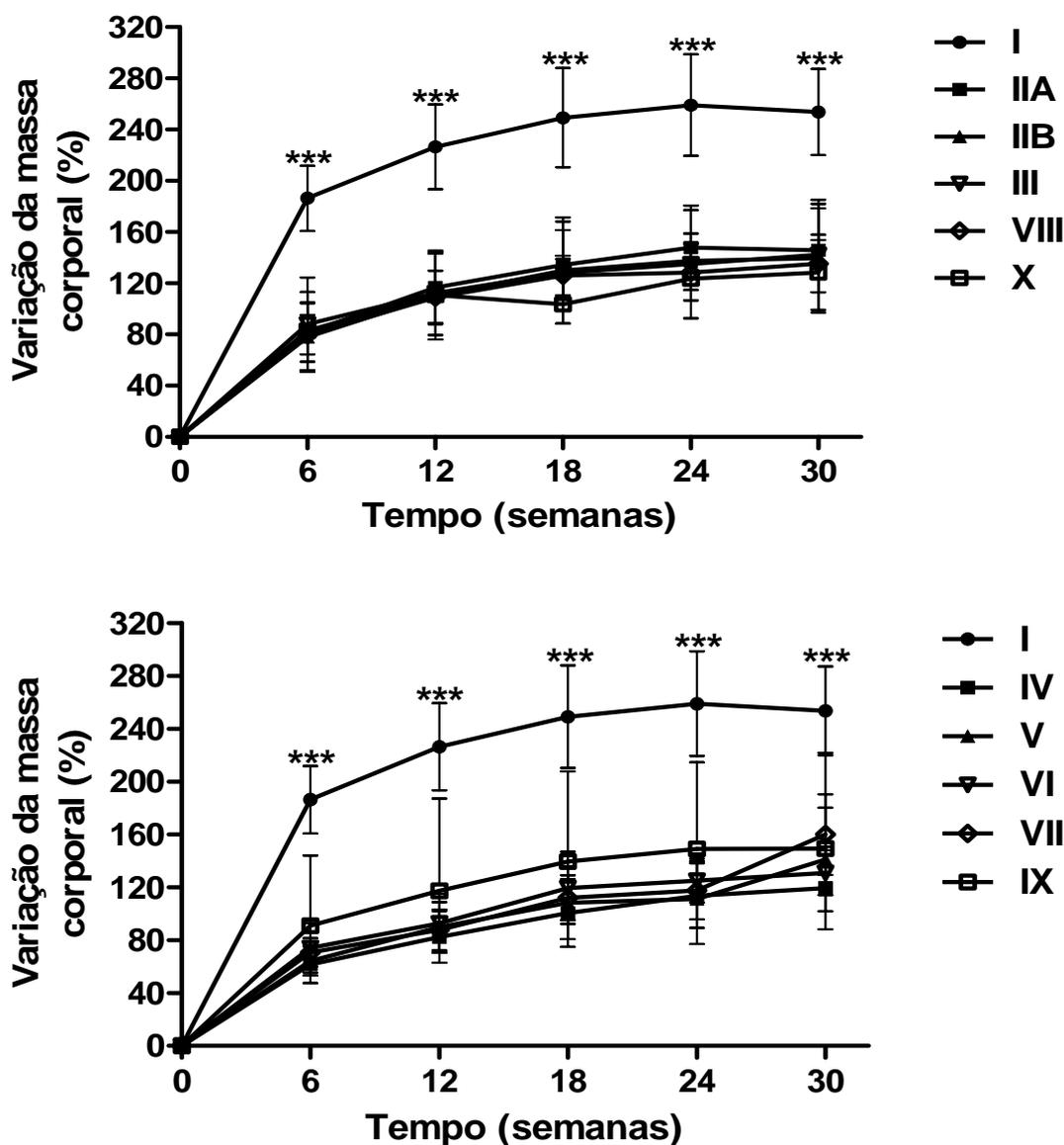


FIGURA 29 – Variação temporal da massa corporal (Δ MC), em termos percentuais, verificada nos grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, IV, V, VI, VII e IX, durante as primeiras 30 semanas do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Constatou-se que a Δ MC mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos, em todos os tempos estudados.

Para a avaliação da Variação temporal da massa corporal (Δ MC), 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 Δ MC (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 30).

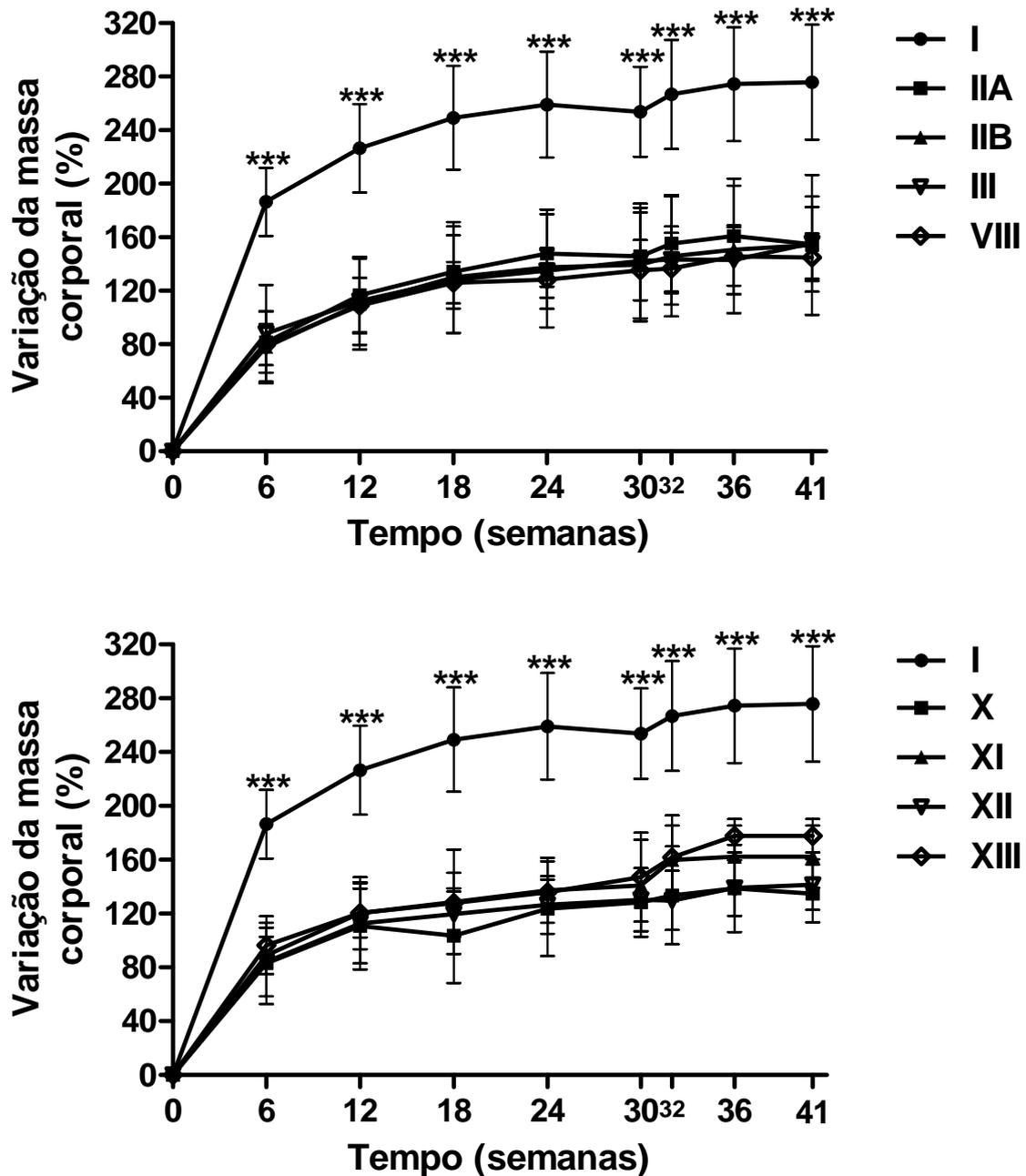


FIGURA 30 – Variação temporal da massa corporal (Δ MC), em termos percentuais, verificada nos grupos I, IIA, IIB, III, VIII, X, XI, XII e XIII, durante as 41 semanas do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Constatou-se que a Δ MC mensurada no grupo I foi significativamente maior ($P < 0,0001$) que a verificada nos demais grupos em todos os tempos estudados.

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 31).

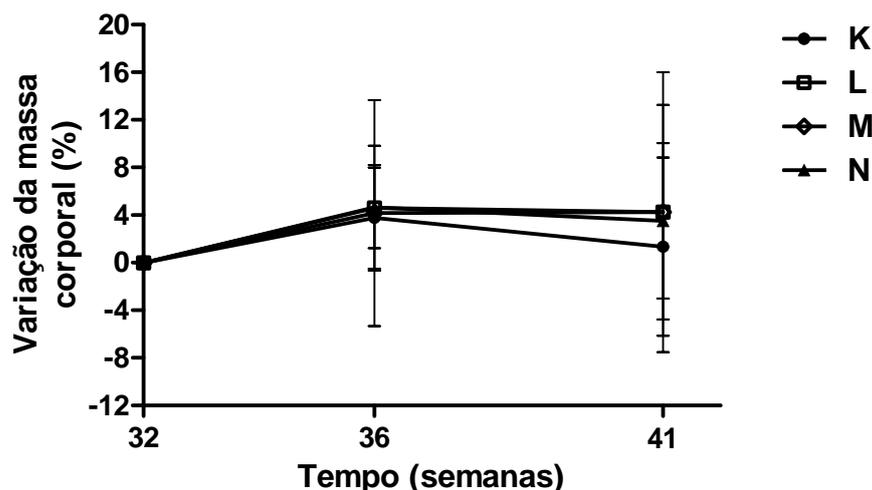


FIGURA 31 – Variação temporal da massa corporal (ΔMC), em termos percentuais, verificada nos grupos K, L, M e N, durante o período compreendido entre a 32^a e a 41^a semana do estudo. Dados expressos como média e desvio padrão. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.

4.3.2 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 9 – Apêndice D).

TABELA 9 – 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.

| Peso do corpo, Fígado, Baço e Rins em gramas, no momento da eutanásia ou óbito | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|-------------|-------------|----------------|
| Média e Desvio Padrão | | | | | |
| Grupo e Tratamento | Número de animais | 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.

4.3.3 Consumo de própolis e lisina

No Apêndice B

4.3.4 Evolução clínica, mortalidade, sobrevida e causa *mortis* dos animais

4.3.4.1 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 5 casos e a bexiga tumoral foi o primeiro órgão a ser ingerido pelos animais. Ao final das 41ª semana 85% dos animais apresentavam hematúria macroscópica.

A hemoptise ocorreu em 5 animais dos grupos que foram submetidos a gavagem com própolis durante o procedimento, sem outras complicações. 5 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, 7 de 58 animais (grupos que receberam apenas carcinógeno) e 3 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 10 animais (12,50%). Estes animais foram excluídos da avaliação final (Tabela 10).

Entre a 32ª semana a 41ª semana, ocorreram 27 óbitos (23,47%). Em 41 semanas o total foi de 37 óbitos (29,06%) (Tabela 11).

4.3.4.2. Mortalidade: Encontram-se nas Tabelas 10 e 11 a mortalidade ocorrida nas 41 semanas.

TABELA 10 - Mortalidade entre a 1ª semana a 31ª semana .

| MORTALIDADE ENTRE A 1ª E 31ª SEMANA | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|-----|----|--------|---------|-----|-----|-----|
| Grupo | Substância | N | Nº | % | SEMANAS | | | |
| | | | | | 23s | 29s | 30s | 31s |
| I | BBN/P/L P 1 mês antes | 10 | 0 | 00,00 | | | | |
| IIA | BBN/P/L Subcutâneo | 07 | 0 | 00,00 | | | | |
| IIB | BBN/H ₂ O Subcutâneo | 06 | 0 | 00,00 | | | | |
| III | BBN/P/L intra- gástrica | 10 | 1 | 20,00 | | | 01 | |
| VIII | BBN/P/L intra- gástrica | 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 Intra-gástrica | 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; N°- 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.

TABELA 11 - Mortalidade entre a 32ª semana 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 | 10 | 0 | 00,00 | | | | | | | | |
| IIA | P 1 mês antes | | | | | | | | | | | |
| | BBN/P/L | 07 | 1 | 14,28 | | | | | | 01 | | |
| IIB | Subcutâneo | | | | | | | | | | | |
| | BBN/H ₂ O | 06 | 0 | 00,00 | | | | | | | | |
| III (III+VIII) | Subcutâneo | | | | | | | | | | | |
| | BBN/P/L | 17 | 6 | 30,00 | | | 01 | | | 01 | 03 | 01 |
| | Intra-gástrica | | | | | | | | | | | |
| | | 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 | |
| X | | 51 | 18 | 35,29 | | | | | | | | |
| | BBN/L | 06 | 1 | 16,66 | | | | | | | 01 | |
| | Intra-gástrica | | | | | | | | | | | |
| | | 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 | | | | | | | | |
| Total Geral | | | | | | | | | | | | |
| 1ª e 41ª s | | 125 | 37 | 29,06 | | | | | | | | |

N- ene; N^o- 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

4.3.4. 2 Análise de sobrevida

Baseadas nas tabelas anteriores 11 e 12, a análise de sobrevida 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 32)

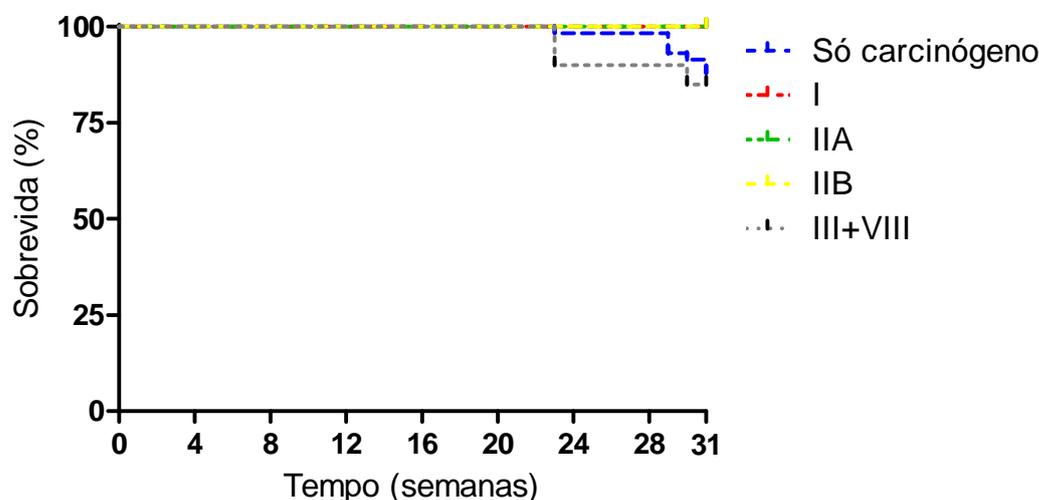


FIGURA 32 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos que receberam só carcinógeno (IV+V+VI+VII+IX), I, IIA, IIB e III+VIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as primeiras 31 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou 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%.

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 33).

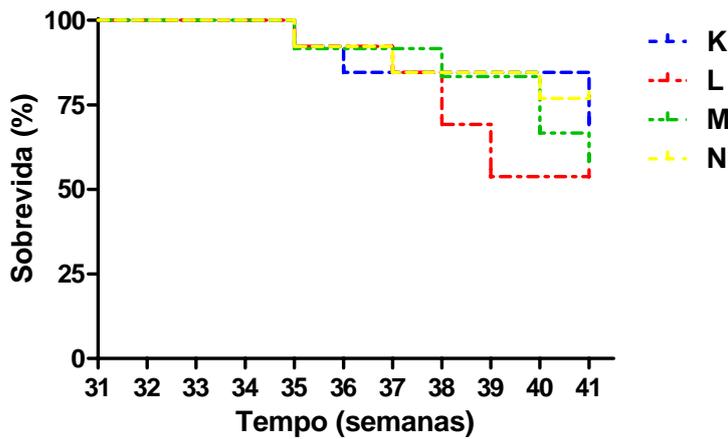


FIGURA 33 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, L, M, N construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes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

Comparando os grupos K, I, III, XI, XII e XIII entre o período de 31ª semana 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 que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes (Figura 34).

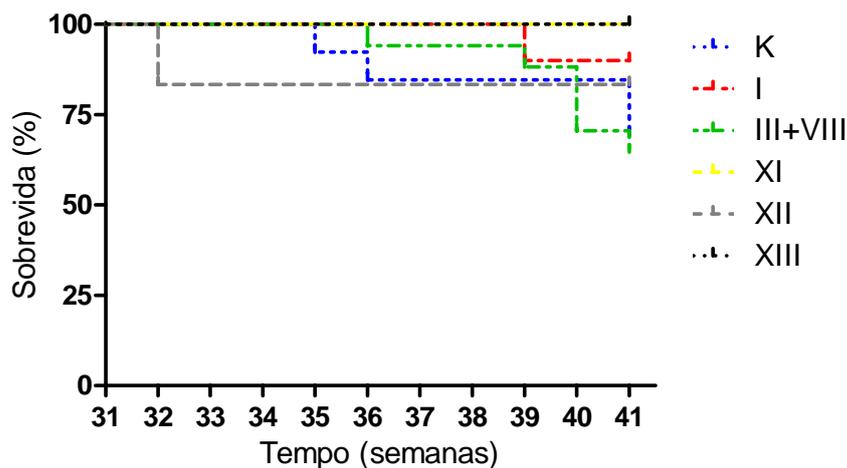


FIGURA 34 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,2952$). Sobrevivência na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; III+VIII = 64,71%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos X, I, III, XI, XII e XIII, considerando o período entre a 31ª semana 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 35).

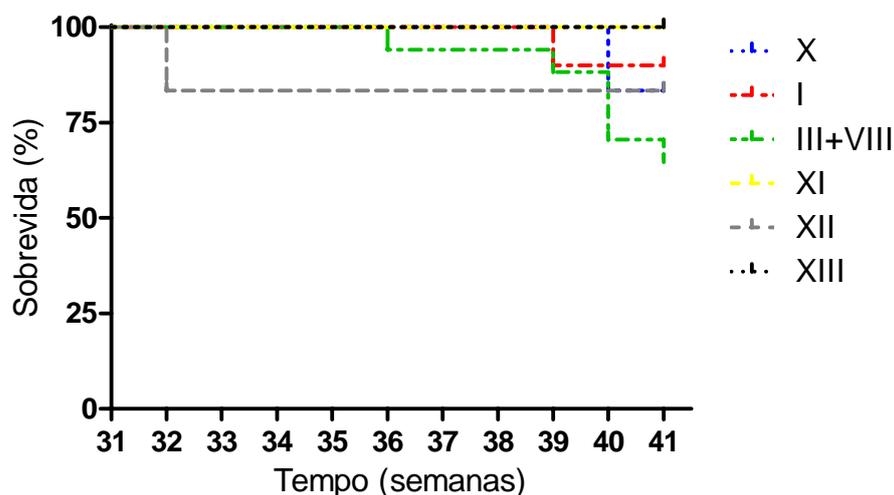


FIGURA 35 – Curvas de sobrevivência referentes aos grupos X, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando o período entre a 31ª e a 41ª semana do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,3070$). Sobrevivência na 41ª semana do experimento: X = 83,33%; I = 90,00%; III+VIII = 64,71%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Ao comparar as curvas de sobrevivência referentes aos grupos K, 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 36).

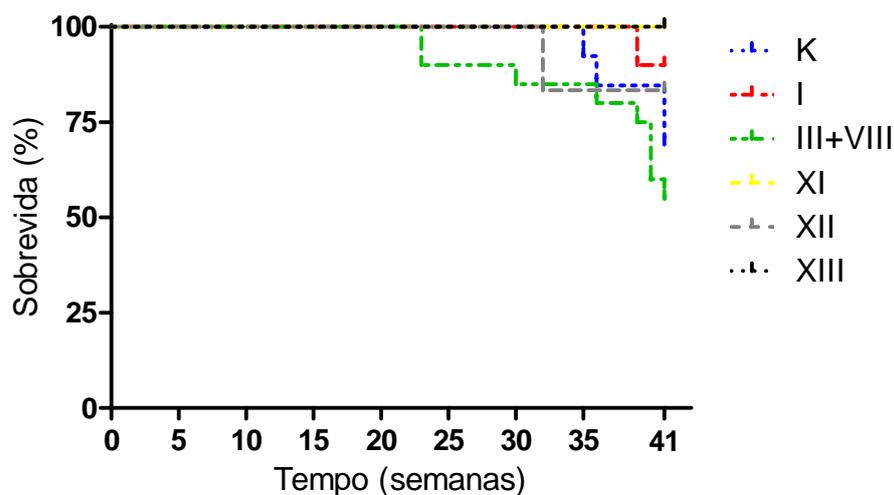


FIGURA 36 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos K, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0869$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Ao comparar as curvas de sobrevida 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 37).

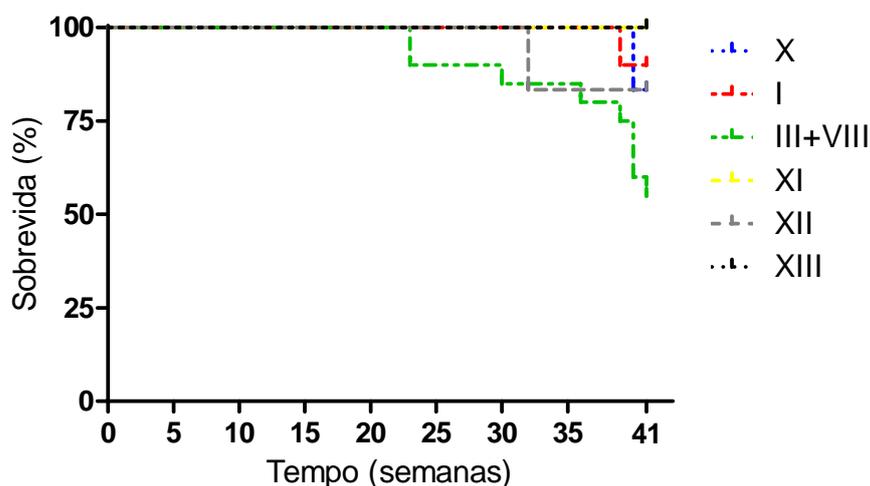


FIGURA 37 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos X, I, III+VIII, XI, XII e XIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0673$). Sobrevida na 41ª semana do experimento: X = 83,33%; I = 90,00%; III+VIII = 55,00%; XI = 100,00%; XII = 83,33%; XIII = 100,00%.

Ao comparar as curvas de sobrevida referentes aos grupos K, I, IIA, IIB e III+VIII, considerando as 41^a 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 38).

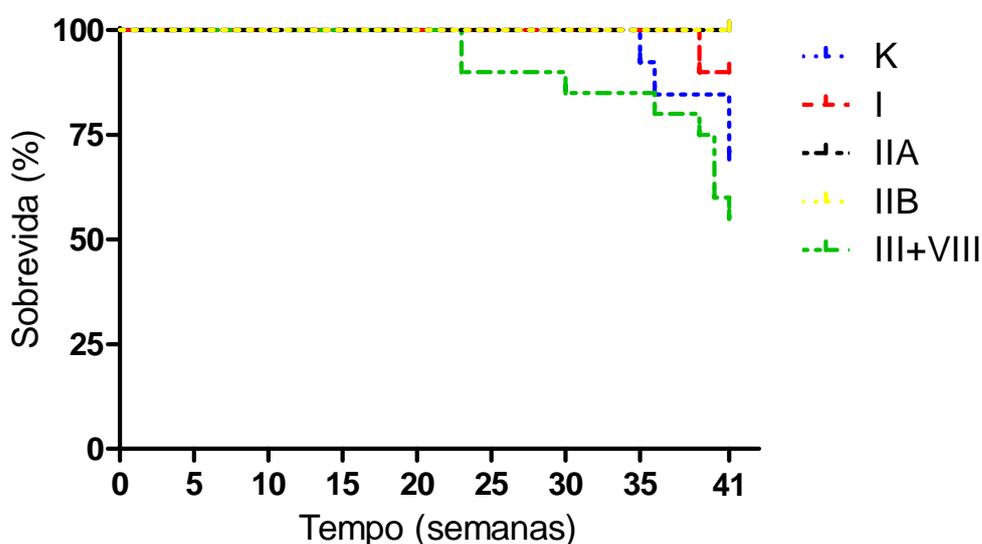


FIGURA 38 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos K, I, IIA, IIB e III+VIII, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando as 41 semanas do experimento. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que evidenciou diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0463$) entre elas. Todavia, comparando-se as curvas duas a duas, após efetuar o ajuste para múltiplas comparações usando o método de Bonferroni (limite de significância = $0,05/10 = 0,005$), não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes. Sobrevida na 41^a semana do experimento: K = 69,23%; I = 90,00%; IIA = 100,00%; IIB = 100,00%; III+VIII = 55,00%.

4.3.4.3 -Causa *mortis*:

As causas *mortis* entre a 1^a e a 31^a semana encontram-se na Tabela 12.

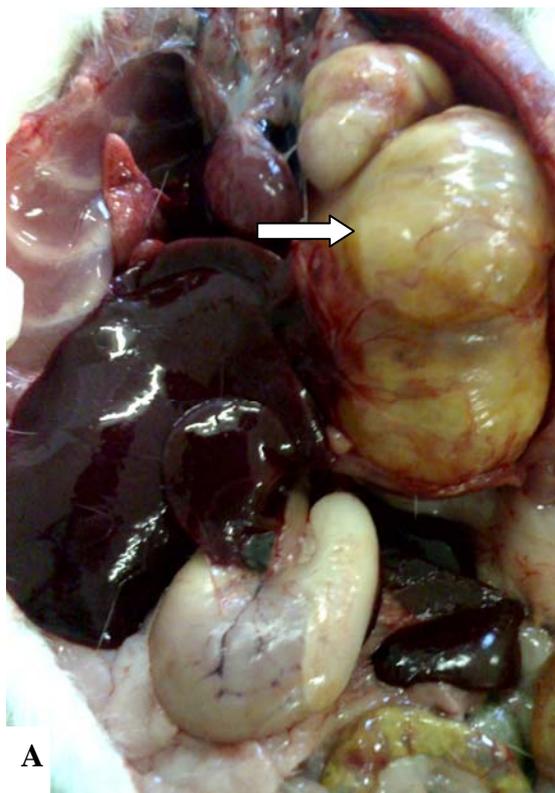
TABELA 12- Causa *mortis* entre a 1^a e a 31^a semana

| Causa <i>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) |

A causa *mortis* mais frequente entre a 32^a e a 41^a foi a broncopneumonia. Os números podem ser observados na Tabela 13 e nas Figuras 39 e 40.

TABELA 13 - Causa *mortis* entre a 32^a e a 41^a semana.

| Causa <i>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) |



A



B

FIGURA 39 – 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 2,0 cm. 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).

Em um dos ratos que apresentava ascite, ao exame no citômetro, observou-se escassez de células - fase G1. Na autopsia foi identificada fistula pielo-abdominal, por ruptura de cápsula renal (pielonefrite e hidronefrose por obstrução tumoral) (Figura 40).

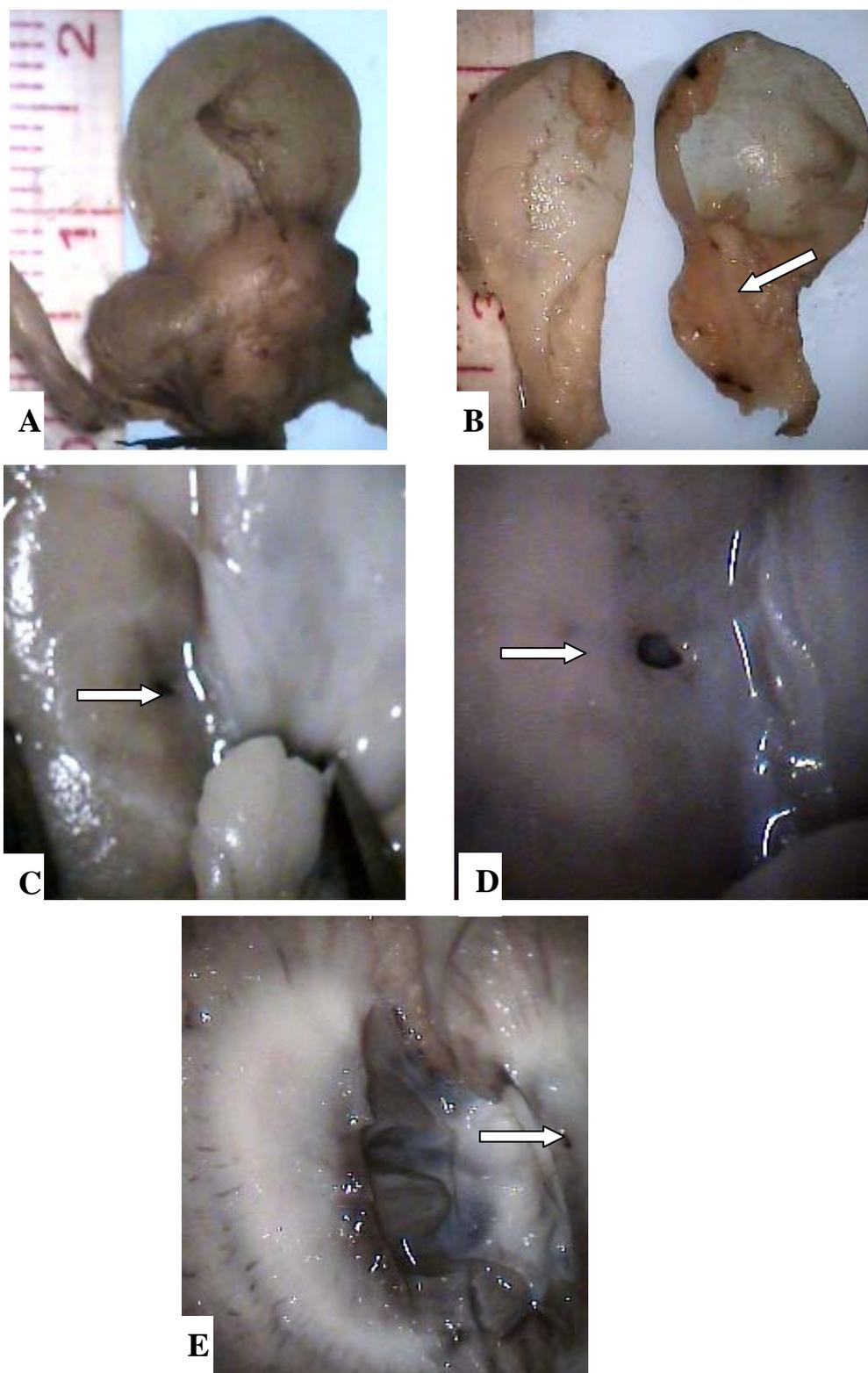


FIGURA 40 - A-Bexiga apresenta tumoração em nível de óstio ureteral com ureter dilatado; B- Bexiga aberta, detalhes da tumoração; C, D, E - Rim esquerdo - fistula piélica (setas), dilatação piélica - Grupo L - Rato 5.

4.3.5 Ultrassonografia.

As imagens ultrassonográficas identificaram tumorações e determinaram o início do tratamento (grupos K, L, M e N) e evolução das lesões entre a 31ª e 40ª semana (Figura 41)

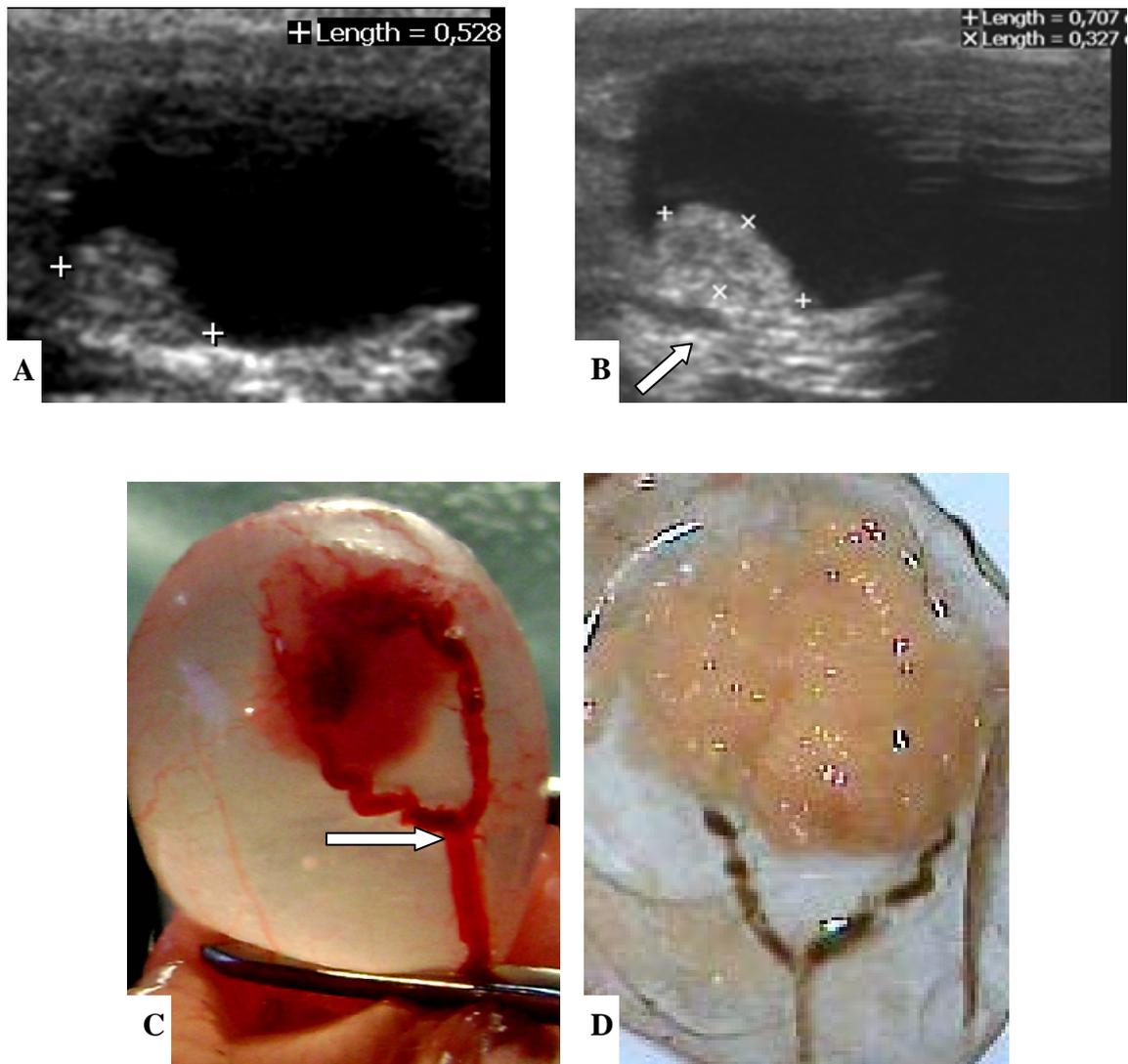


FIGURA 41 – A e B - Ultrassonografia na 31ª e 40ª semana evidencia imagem tumoral em parede posterior, fazendo projeção para o interior da bexiga (detalhe do vaso em seta branca em B); C - Mesma bexiga *in vivo* por transluminação observa-se tumoração intravesical com vasos calibrosos e tortuosos em 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.

Algumas complicações do carcinoma de bexiga de grande volume foram flagradas no exame de ultrassonografia (Figura 42)

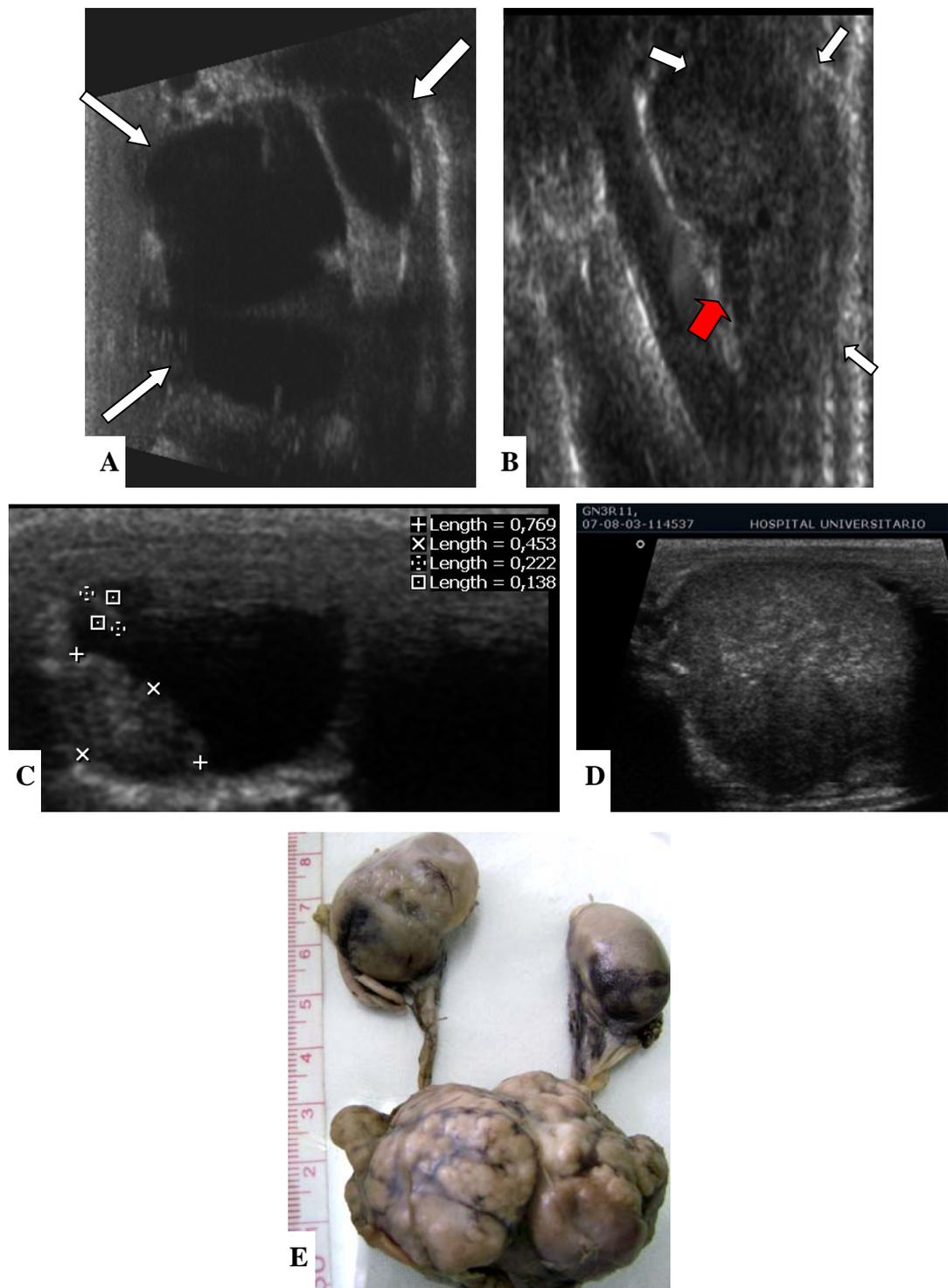


FIGURA 42 - Ultrassonografia (US) 40ª semana: A- Rim direito, lojas de cálices e pelves dilatados (setas); B - US rim esquerdo (setas brancas) com discreta hidronefrose (seta vermelha); C – US de bexiga na 31ª semana D - US tumoração intravesical sólida de grande volume (3,5 x 2,5x 3,0 cm); E- Peça fixada mostra rim direito (3,0 cm) e esquerdo (2,0 cm) aumentados, ureteres dilatados, grande tumoração vesical infiltrante, envolvendo mesentério medindo 5, 5 x 3,0 x 3,0 cm (Grupo N Rato 11).

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. Os dados podem ser consultados em Tabelas do Apêndice E.

A Tabela 14 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 2 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 14 - 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 |
| Subtotal | | | | | | |
| Total | 99 | 21 | 21,21 | 84 | 49 | 58,33 |

N ene

Nº número

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

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

Na Tabela 15 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 15 - Número de bexigas sem imagem tumoral na 31ª semana e 40ª semana, por grupo.

N ene

| 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 |
| Subtotal | | | | | | |
| Total | 99 | 22 | 22,00 | 84 | 4 | 4,76 |

Nº número

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

4 bexigas persistiram SI tumorais na 40ª semana e as 4 apresentavam hiperplasias e papilomas na histopatologia (Figura 43).

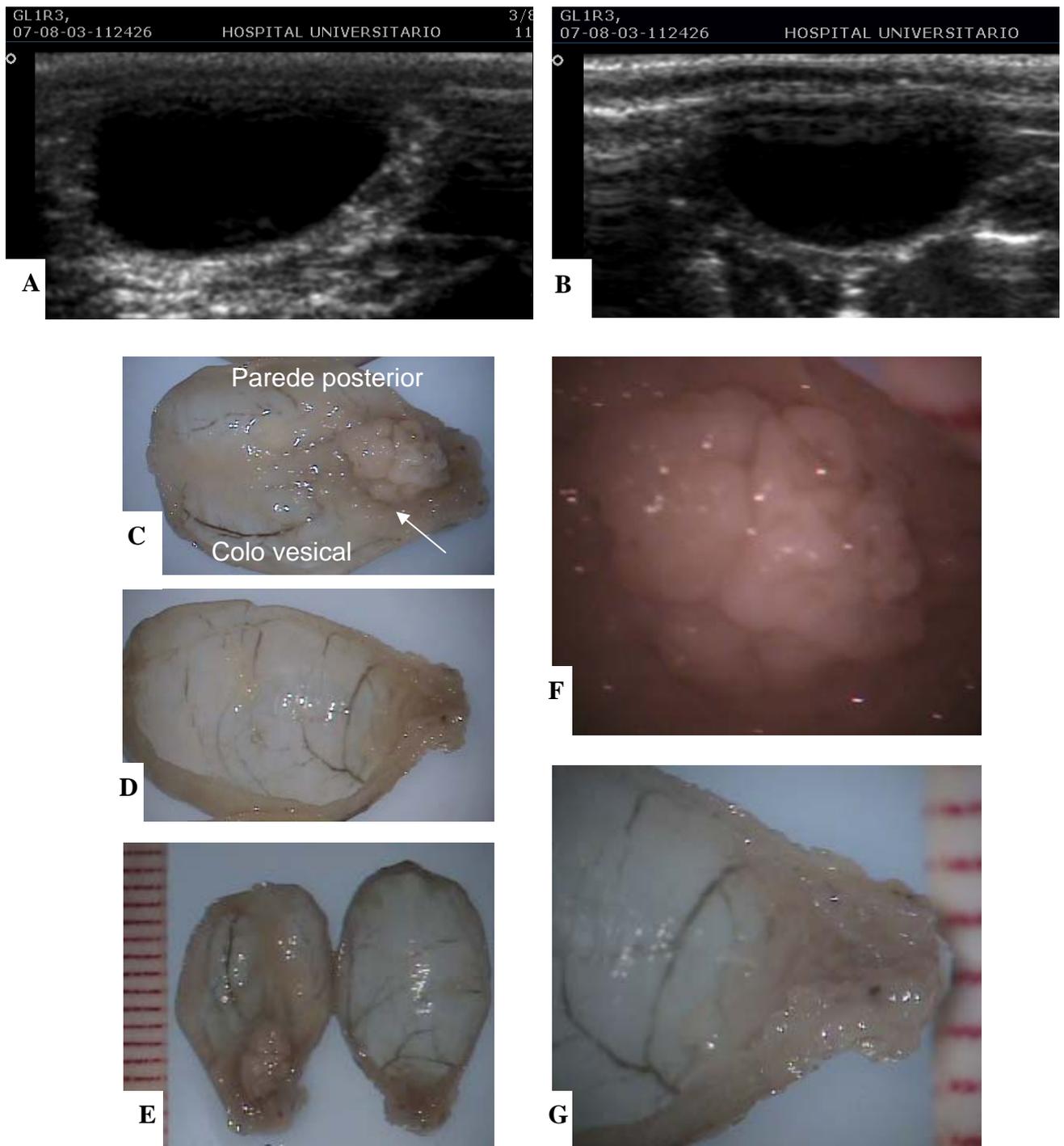


Figura 43 - A e B: Ultrassonografia: Bexiga sem imagem tumoral na 40ª semana; C, D, E, F e G: Exame macroscópico: lesão localizada em colo vesical na parede posterior, polipoide com aspecto de couve-flor medindo 0,4 x 0,3 cm. Outras diminutas lesões podem ser observadas. Aumento de 10 x, 20 x e 40 x em microscópio estereoscópico. Grupo L - Rato 3.

A seguir, na tabela 16, observa-se a correlação entre o número de imagens tumorais na 40ª semana e os achados na microscopia por 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.

TABELA 16 - 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 duas) | | | |
|----------------|----|--------------------------------------------------|---|------------|---|----------------------------------------------|---|-------------|---|
| | | Histopatologia | | | | Histopatologia | | | |
| | | Hiperplasias e Benignas | | Maligna | | Hiperplasias e Benignas | | Maligna | |
| | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| 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 (21,05) | | 4 (10,52) | | 17 (44,73)* | | 8 (21,05) | |
| 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 (17,07) | | 9 (21,95) | | 2 (4,87) | | 19 (46,34)* | |
| X | 06 | 0 | | 0 | | 0 | | 5 (100,00) | |
| Total | 84 | 15 (17,85) | | 13 (15,47) | | 19 (22,61) | | 27 (32,14) | |

Morreram 3 animais, durante os exames de Ultrassonografia. Um na 31ª semana e dois na 41ª semana. Os animais apresentavam broncopneumonia ao exame de necropsia.

4.3.6 Exame macroscópico:

Ao final da 41^a semana, 100% dos animais que foram submetidos à carcinogênese apresentavam lesões tumorais multifocais de diversos tamanhos, em parede vesical (observadas através de transluminação) (Figura 44), algumas delas de tamanho volumoso, invadindo a parede se infiltrando em tecidos adjacentes, linfonodos locais, outras comprimindo ureter com hidronefrose unilateral ou bilateral (Figura 45).

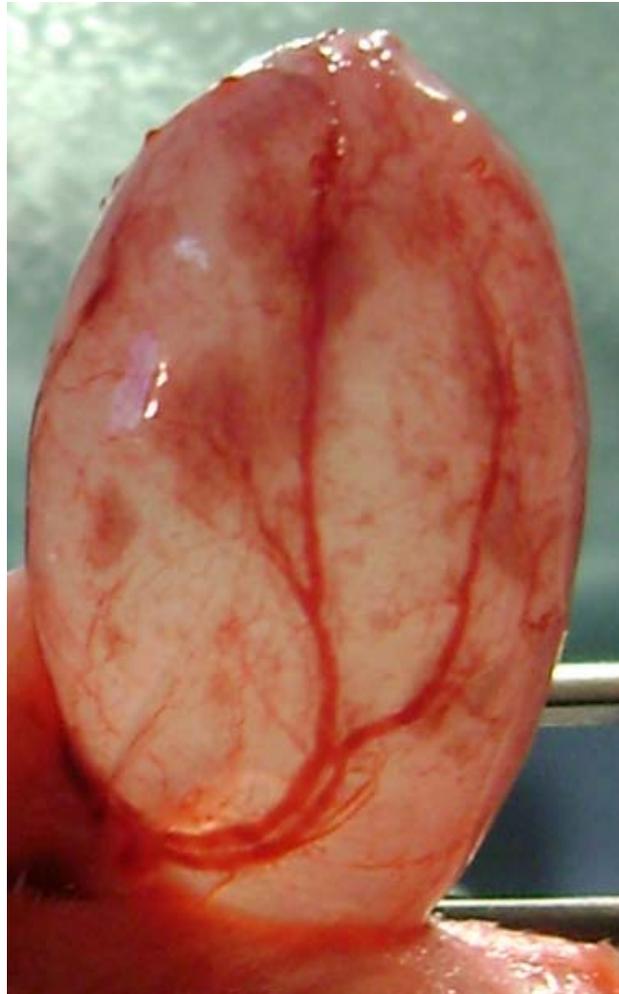


Figura 44 - Bexiga cheia transluminada apresentando múltiplas sombras de múltiplas lesões tumorais em parede vesical distribuídas difusamente. Vasos calibrosos direcionados para lesões maiores (Grupo L - Rato 10).

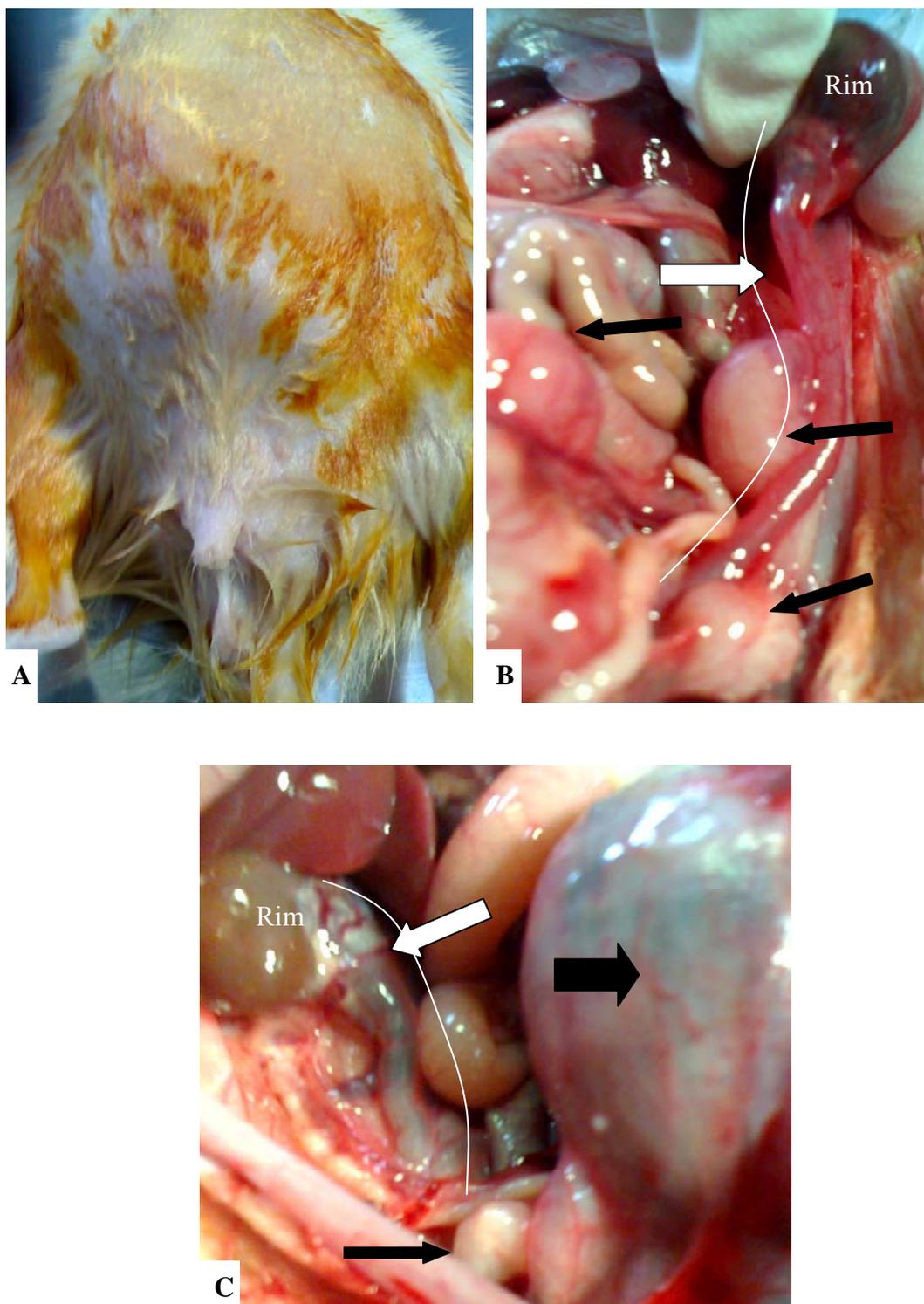


FIGURA 45 - A- Abdome volumoso com massas visíveis; B e C - Ureterohidronefrose bilateral ureteres dilatados (setas e contorno de linhas brancas) e bexiga com tumor e lifonodos (setas pretas) (Grupo III - Rato 11-35 semanas)

Observou-se na parede vesical, vasos calibrosos, tortuosos e serpentinosos dirigindo-se para estas tumorações, constituindo uma rede vascular macroscópica (Figura 46)

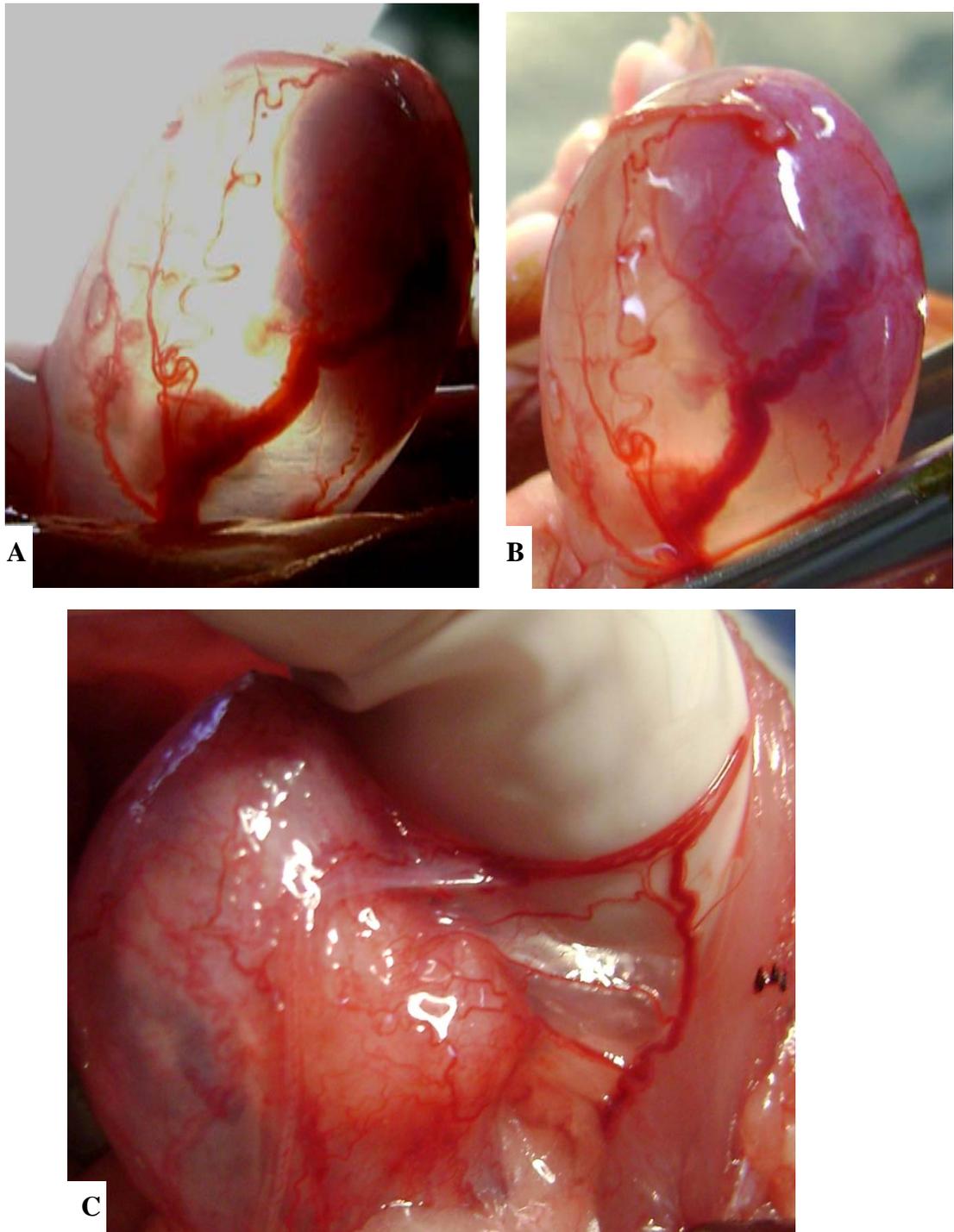


FIGURA 46 - A e B - Bexiga ampliada (mede 1,2 cm) transluminada em ratos anestesiados, onde se veem tumorações intravesicais irrigadas por vasos anômalos espiralados, calibrosos, tortuosos; C - Rede neovascular

proveniente de vasos epigástricos da parede abdominal, nutrindo o tumor que faz protusão além da parede vesical. (Grupo X - Rato 3).

Após fixação as bexigas abertas examinadas apresentavam lesões papilares, polipoides delicadas róseas com aspecto de couve-flor (Figura 47), umas sésseis outras pediculadas, focais ou difusas.

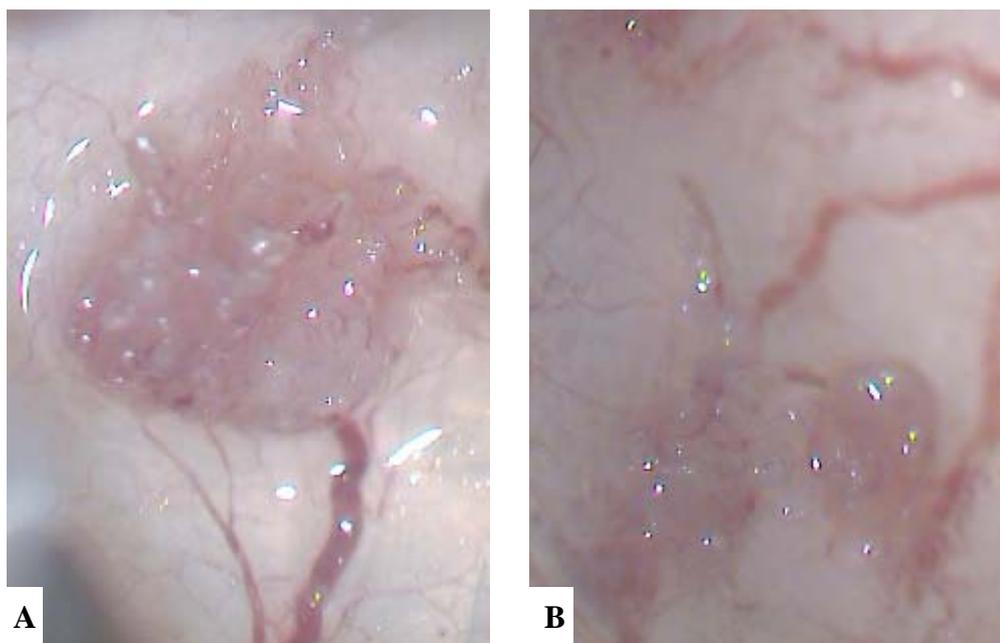


FIGURA 47 –A e B - Bexiga aberta fixada- Lesões papilares delicadas em aspecto de couve-flor intravesical. (Grupo I - Rato 1) Foto em microscópio estereoscópico 20 x de aumento.

Outras tumorações de grande tamanho apresentavam áreas de necrose, hemorragia e urina com odor fétido (Figura 48). Poucas bexigas apresentavam cálculos esbranquiçados em seu interior.



FIGURA 48 - Grande tumoração vesical medindo 5,0 x 5,0 x 3,0 cm, invadindo tecidos adjacentes com áreas extensas de necrose. Os rins estão preservados (Grupo X - Rato 2).

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 3 ratos. A tumoração papilar localizada em pelve renal apresentou invasão de parênquima renal em dois animais (Figura 49).

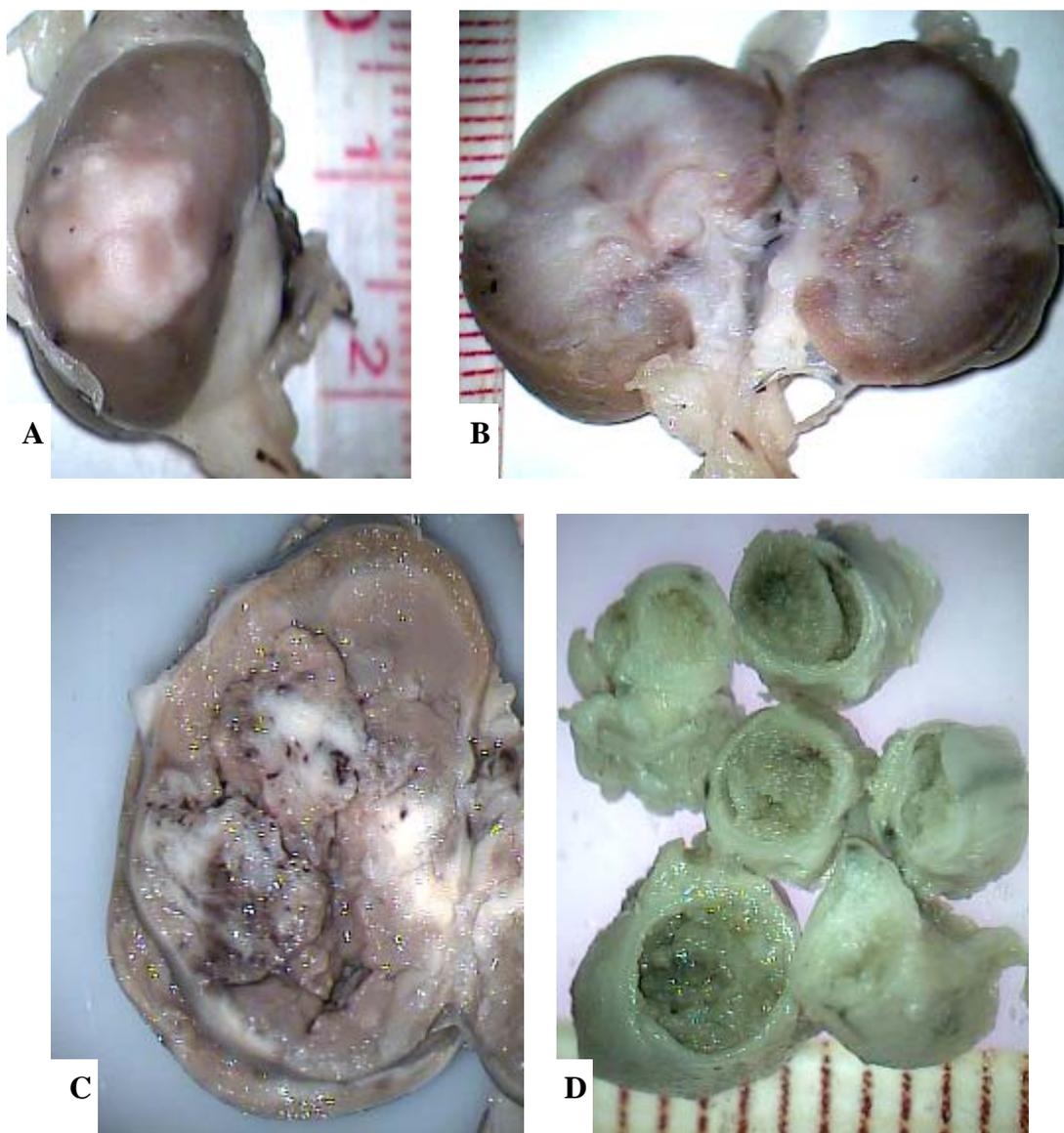


FIGURA 49 - A e B Tumor renal – Nódulos esbranquiçados confluentes em córtex renal e projeção tumoral papilar na pelve e invasão do córtex renal; C - Tumor de pelve renal invadindo todo o parênquima renal com áreas de necrose; D – Cortes transversais de ureter dilatado (até 4mm de diâmetro) com conteúdo tumoral sem infiltração de parede (Grupo X rato 6) (Grupo III - Rato 18)

4.3.7 Avaliação microscópica da carcinogênese

Foram excluídos da avaliação da carcinogênese os 10 ratos que morreram antes da 31ª semana, 3 animais que apresentavam autólise intensa, 3 por apresentarem carcinoma de células transicionais renais e 5 animais vítimas de canibalismo.

Os grupos XI, XII e XIII, que não ingeriram carcinógenos, apresentaram epitélio vesical com 3 camadas sem particularidades (Figura 50).

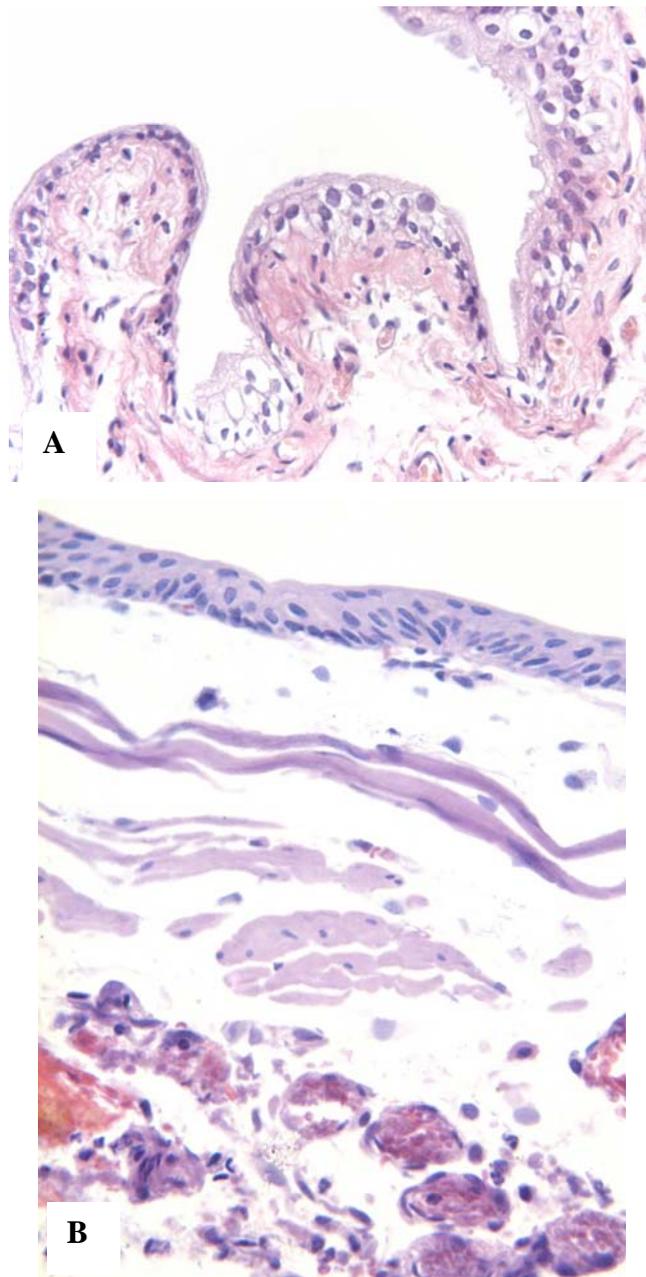


FIGURA 50 - Epitélio vesical normal A- Bexiga vazia: pregas na mucosa; B - Bexiga distendida. Cortes histológicos de parede vesical corados pela HE – 400 x.

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 51 a 53)

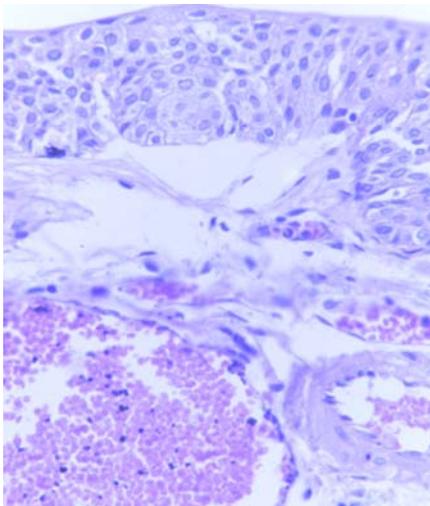


FIGURA 51 - Hiperplasia plana (mais de 3 camadas de células no epitélio) - Grupo I- Rato 2 - Corte histopatológico de lesão vesical corado pelo hematoxilina eosina (HE) - 400 x

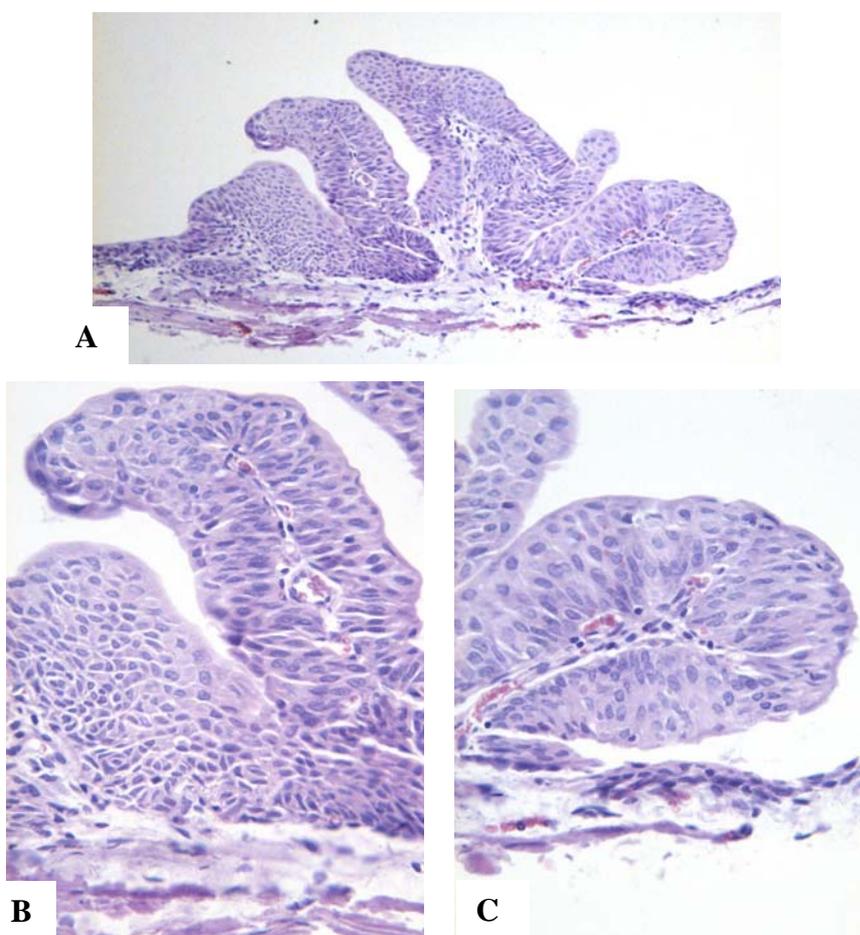


FIGURA 52- A, B e C - Hiperplasia papilar - Projeções papilares com eixo fibrovascular central (Grupo N - Rato 40 x e 400 x). Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE.

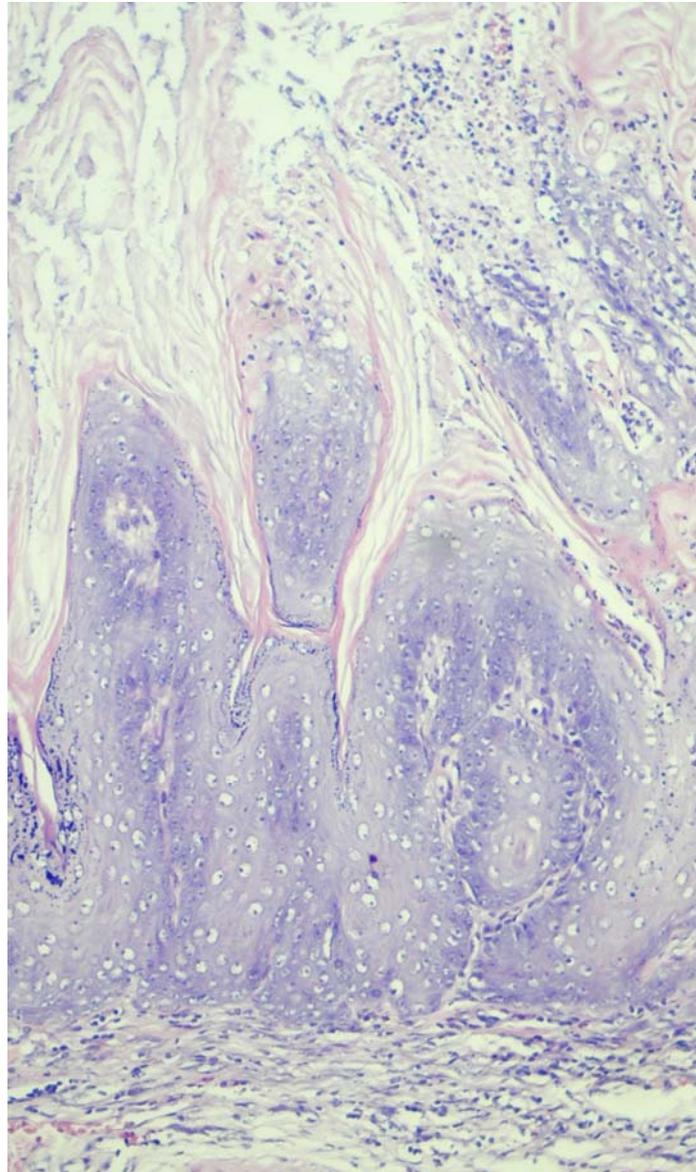


FIGURA 53 - Hiperplasia papilar com metaplasia escamosa e lâminas de ceratina. (Grupo M - Rato 2 -100 x). Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE.

Também foram identificadas lesões neoplásicas benignas: papilomas (exofíticos e endofíticos) em epitélio vesical e epitélio de pelve renal com ou sem metaplasia escamosa ou glandular (Figuras 54 e 55).

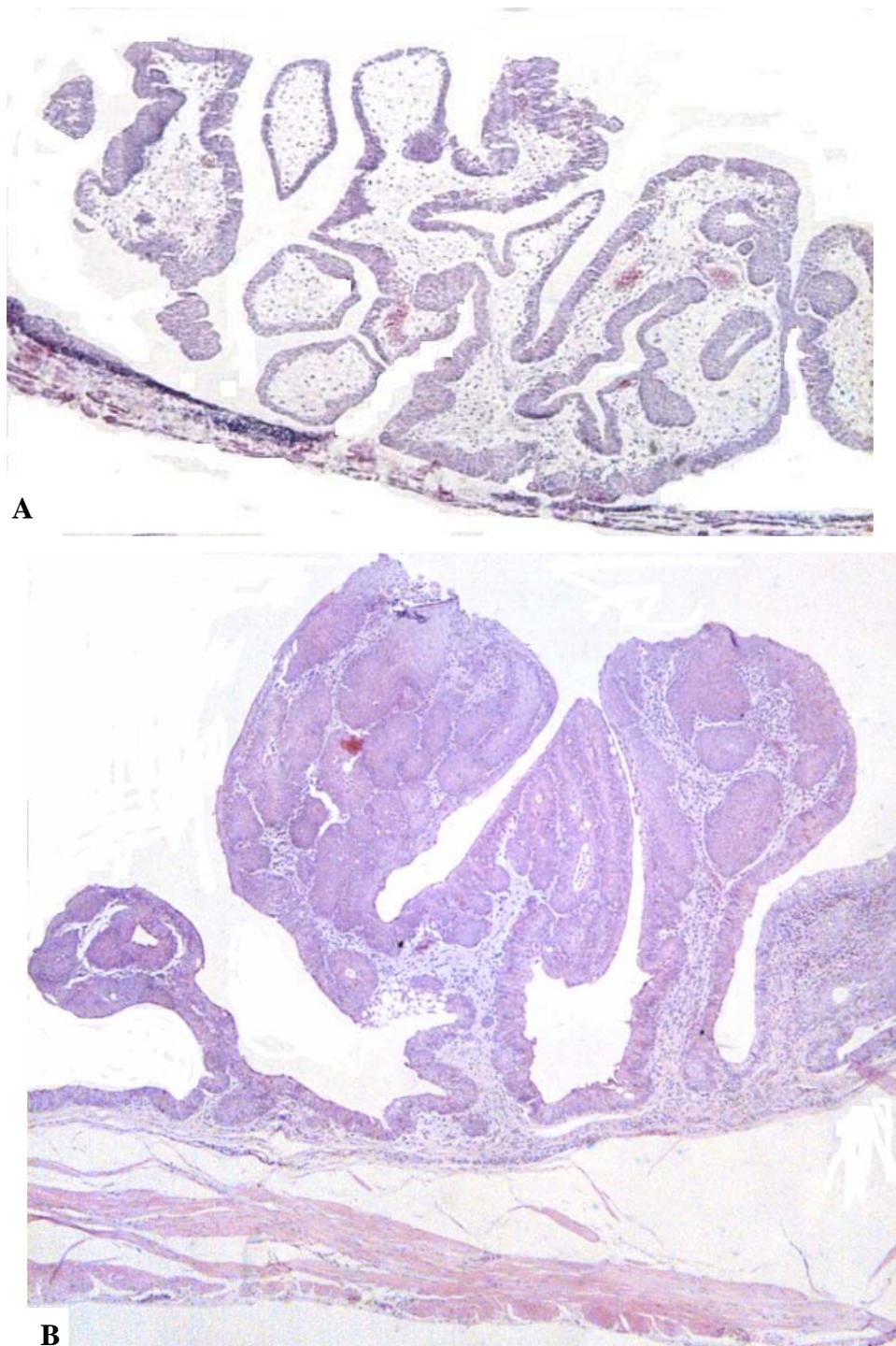
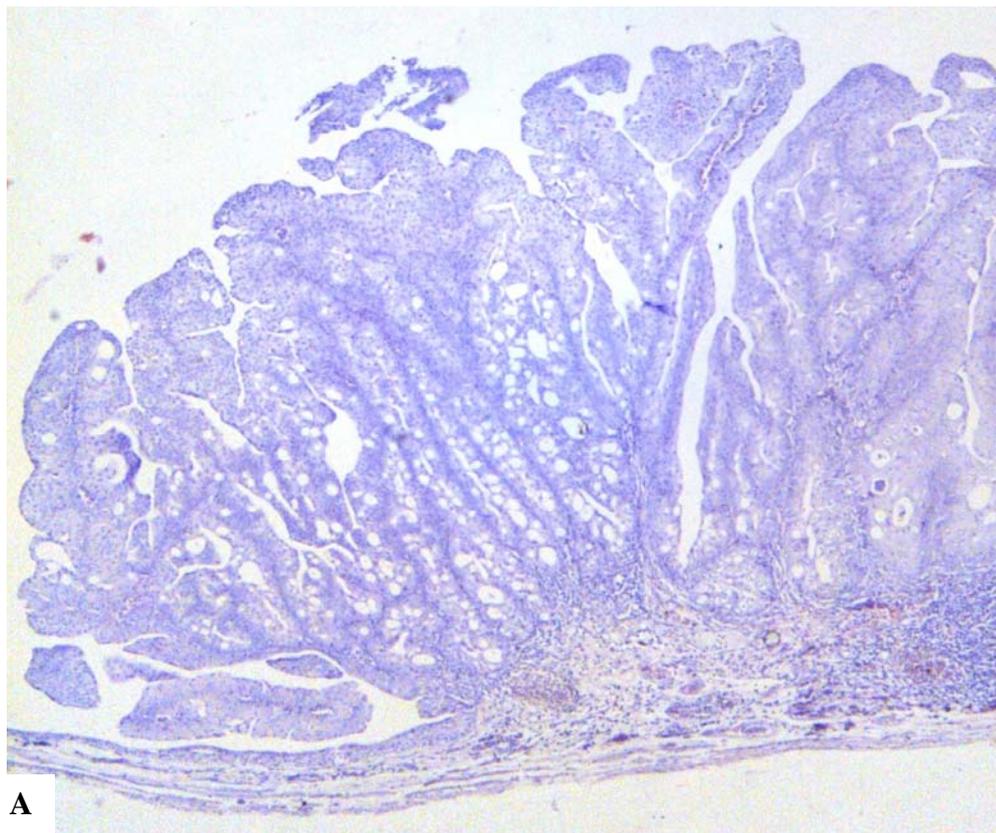
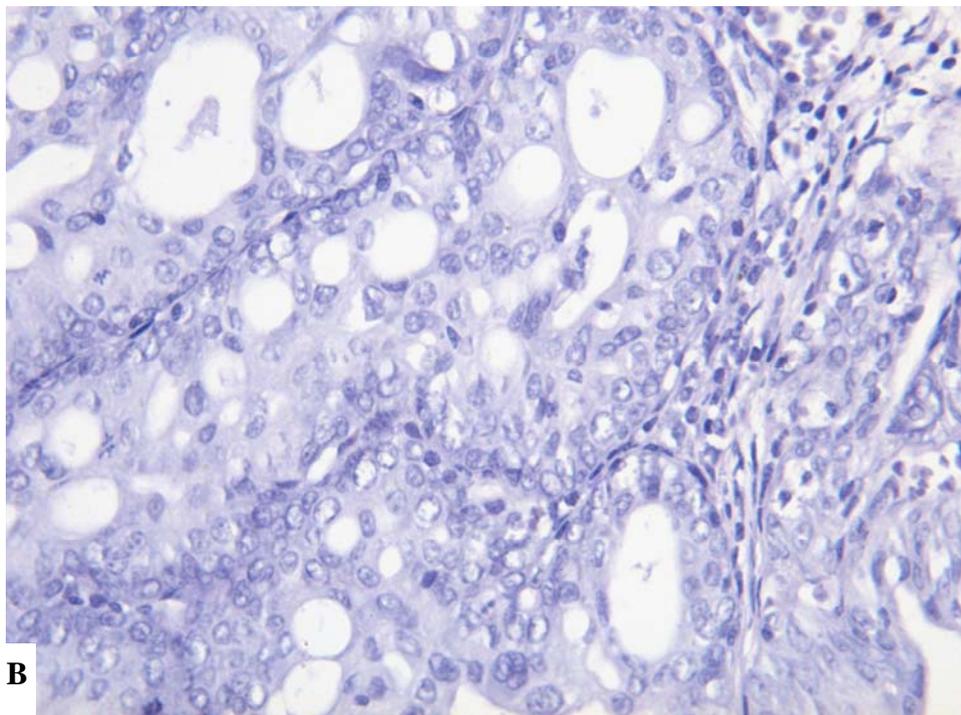


FIGURA 54 – A e B - papiloma exofítico – projeções digitais de tecido transicional com um eixo fibrovascular (Grupo III - Rato 7 – 100 x, Grupo M- Rato 8- 40x) Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE.



A



B

FIGURA 55 - Papiloma exofítico com metaplasia glandular. Observam-se formações papilares de células transicionais e algumas delas com estruturas glandulares apresentando luz e conteúdo mucoide em seu interior. A – 100 x; B – 400 x - Grupo N - Rato 12. Corte histopatológico de lesão vesical corado pela HE

Foram observadas Lesões de Baixo Potencial Maligno (LBPM), com atipias focais (Figura 56) e/ou dúvidas sobre invasão de submucosa.

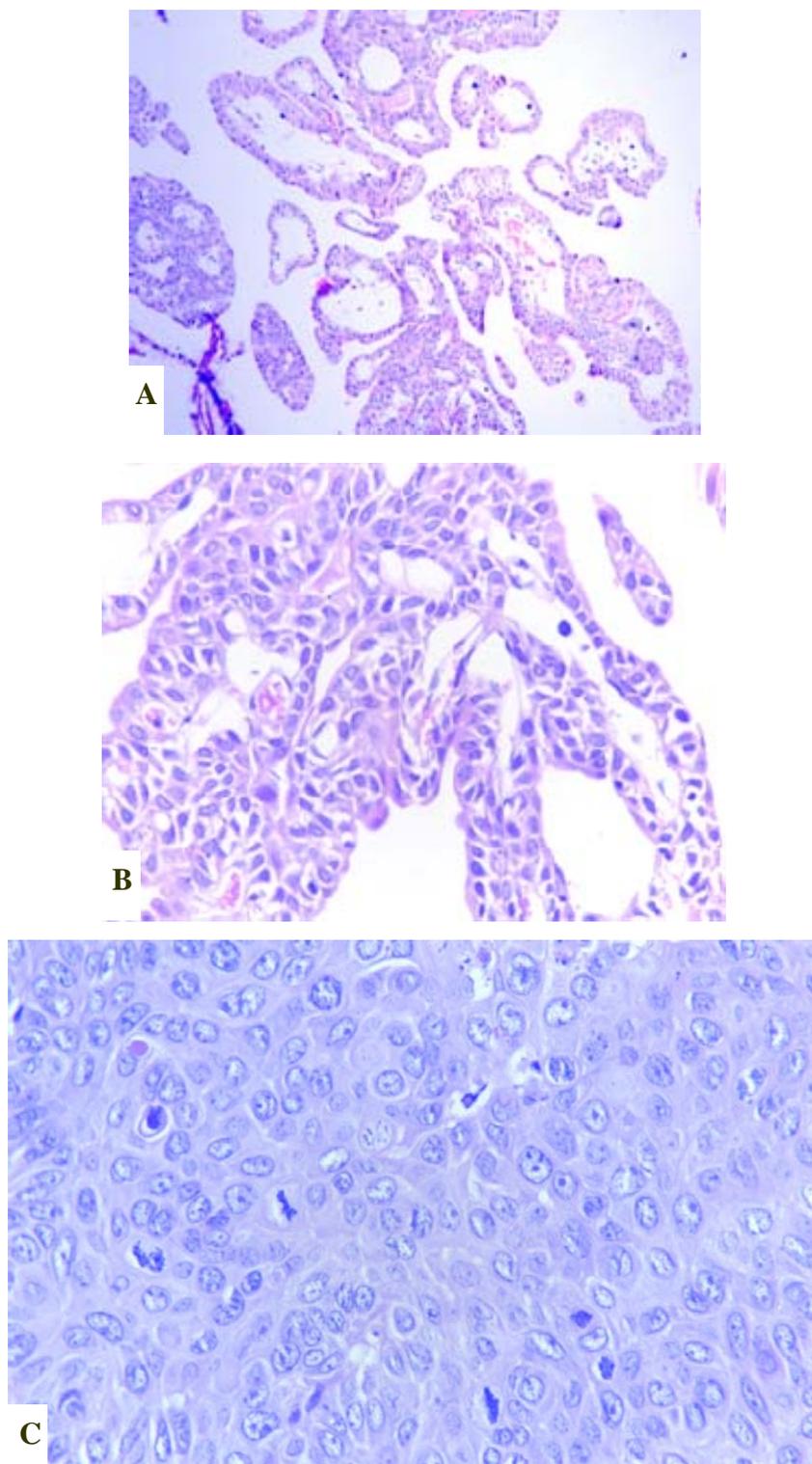


FIGURA 56 - A e B lesão exofítica papilar com raras células atípicas – 40 x e 400 x – LBPM – (Grupo I -Rato 1); C - células atípicas e mitoses atípicas. 400 x – LBPM – (Grupo I - Rato 6) Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.

Papiloma de pelve renal foi identificado em 3 ratos (Figura 57)

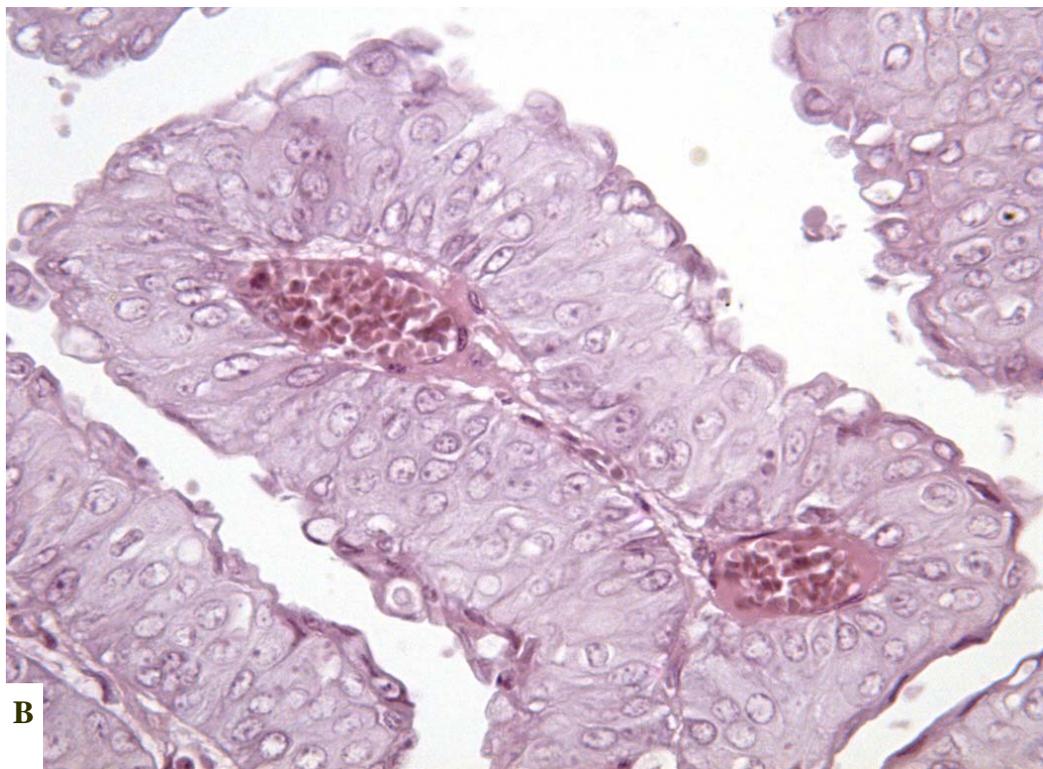
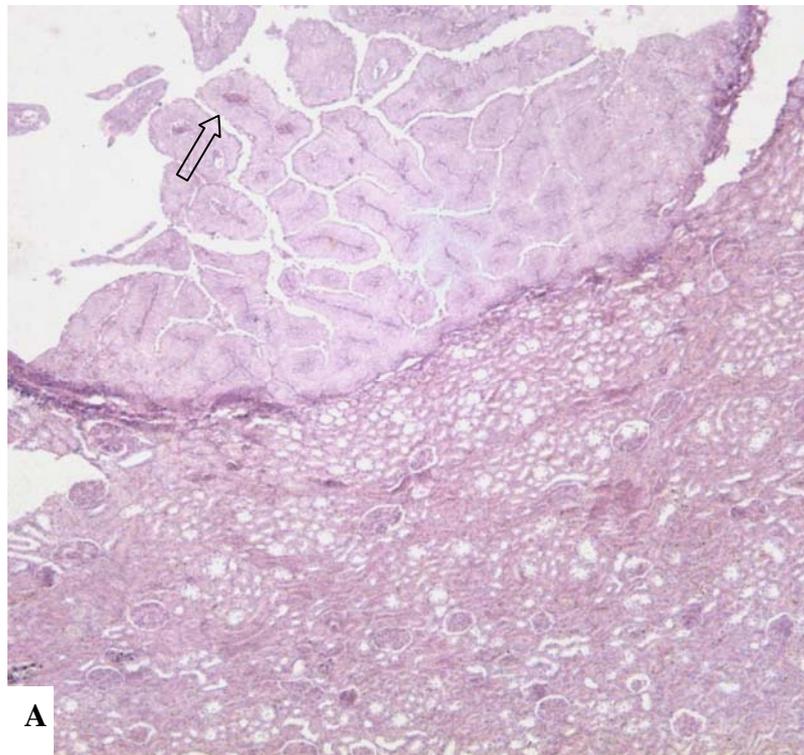


FIGURA 57 - A e B - Papiloma em pelve renal originário no epitélio transicional 40 x 400 x (seta detalhe ampliado (Grupo III – Rato 3). Projeções papilares de células transicionais sem invasão de parênquima renal. Corte histopatológico de lesão renal corado pela HE.

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 oxifilica; CCT com diferenciação basalióide. Carcinoma misto: CCT + *in situ* (3 tumores – Grupo III) CCT + carcinoma escamoso; CCT + adenocarcinoma; CCT + carcinoma escamoso + adenocarcinoma (Figuras 58 a 62).

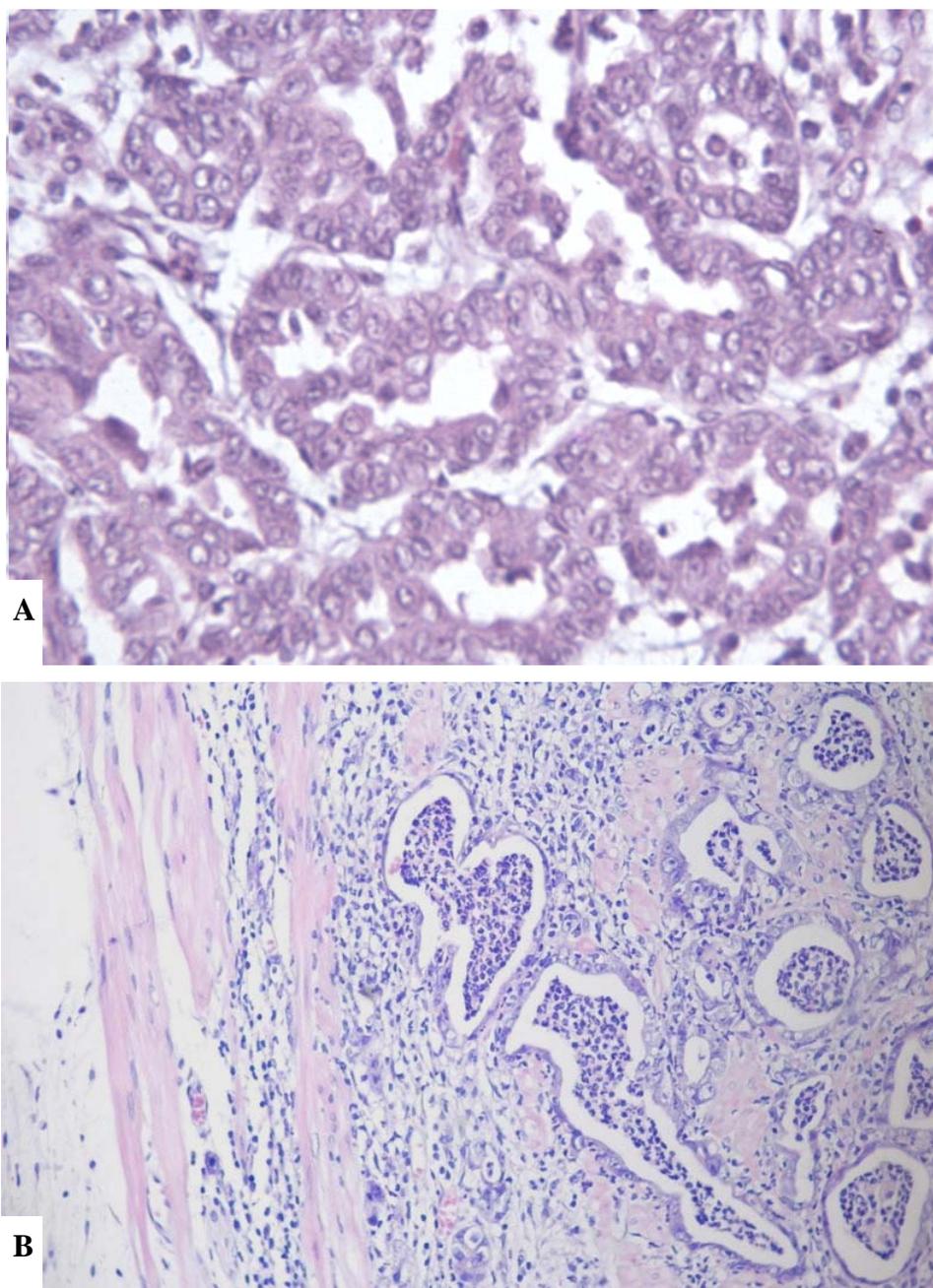
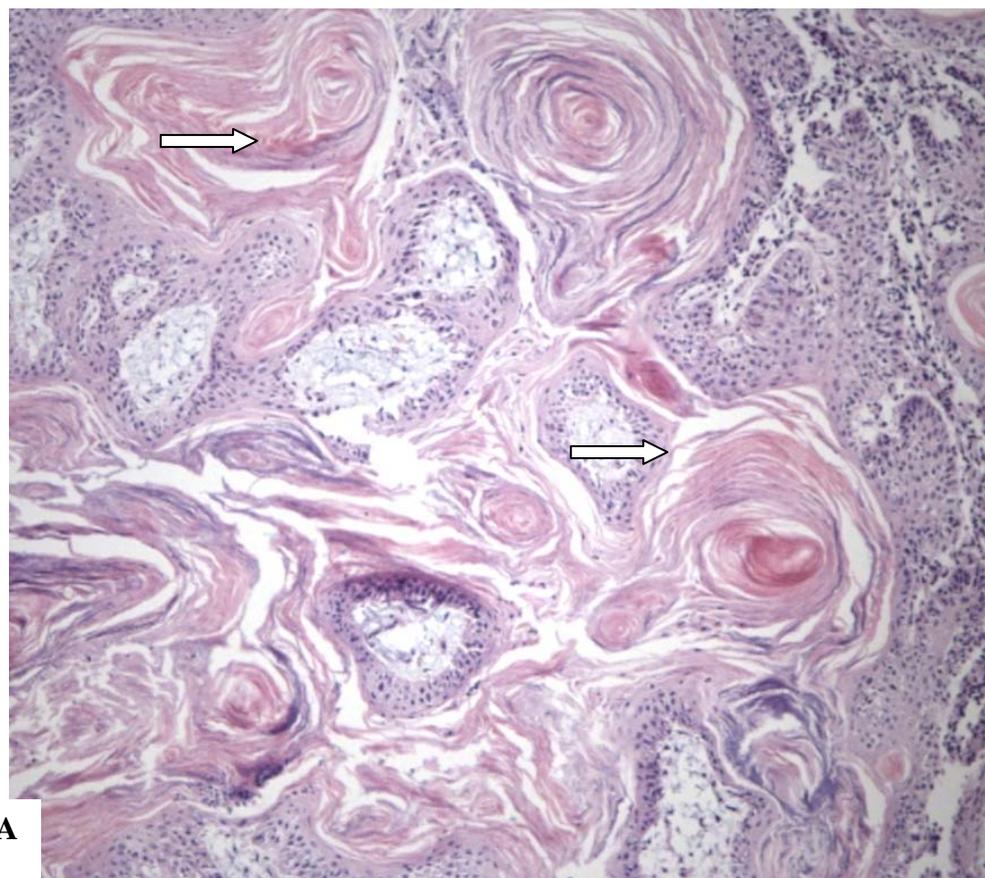
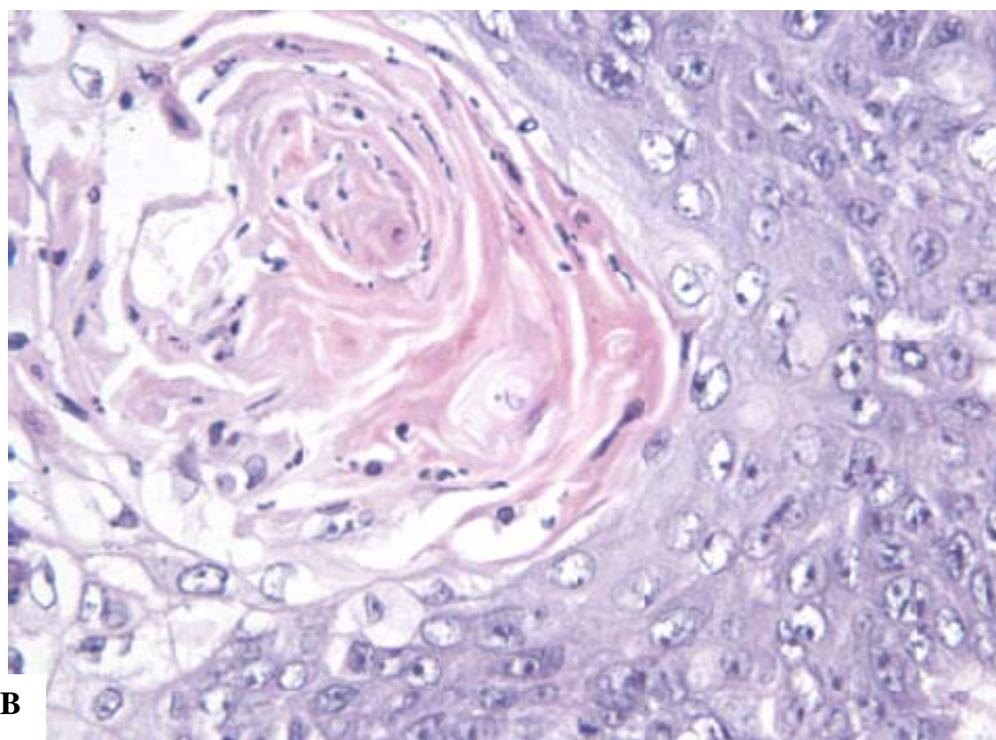


FIGURA 58 - A- CCT com diferenciação glandular, células formando estruturas glandulares. 400 x (Grupo L - Rato 1); B - CCT com diferenciação pseudoglandular, grupos de células tumorais com degeneração e necrose central com invasão em muscular 100 x (Grupo M - Rato 5). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.



A



B

FIGURA 59 - 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.

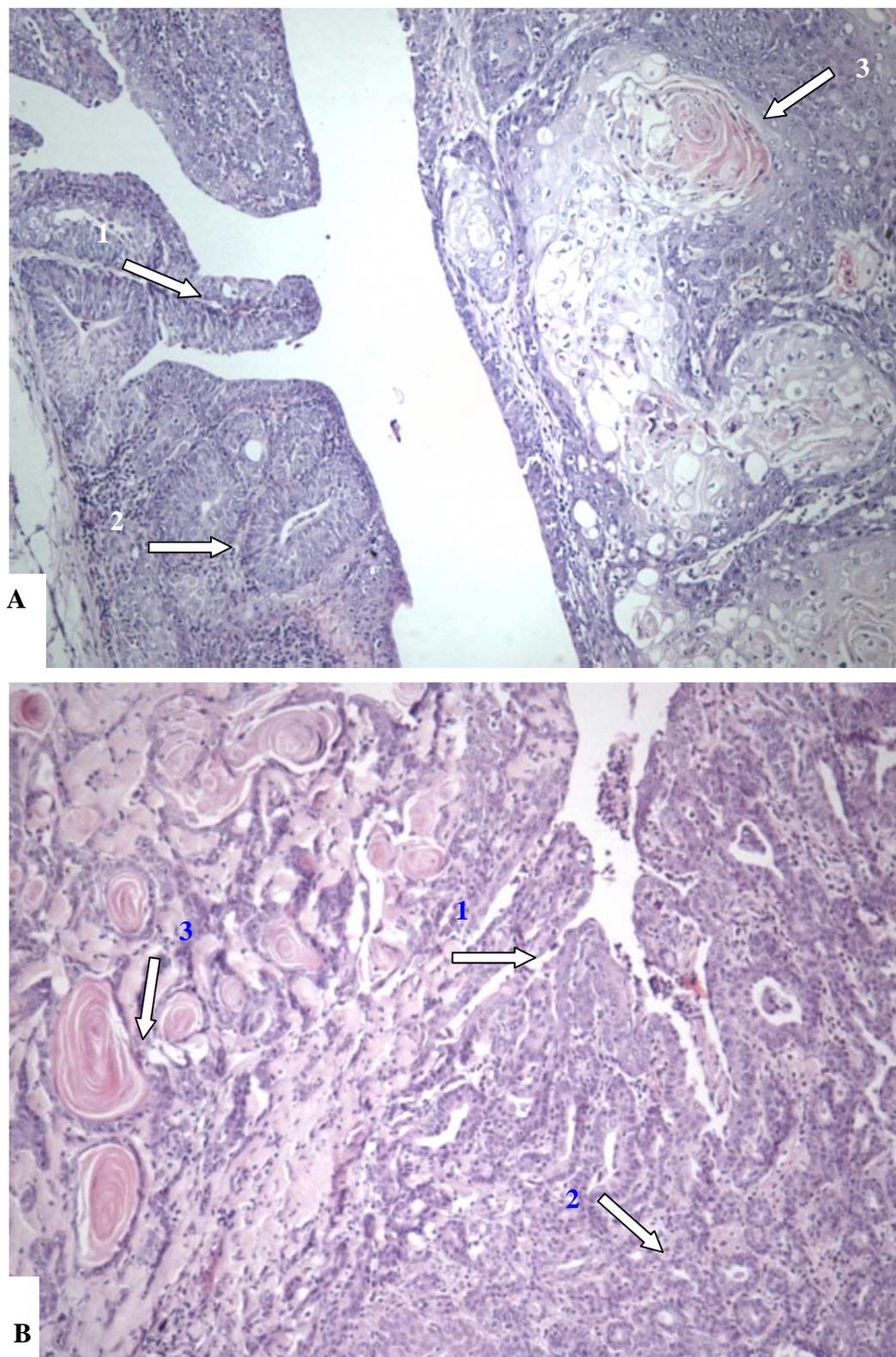


FIGURA 60 - A- CCT com diferenciação escamosa e glandular - formações glandulares, papilares e escamosa com pérolas córneas (setas 1, 2 e 3) 100 x (Grupo X - Rato 2); B - CCT com diferenciação formações glandulares, papilares e escamosa com pérolas córneas (setas 1, 2 e 3) 100 x (Grupo X - Rato 5). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE

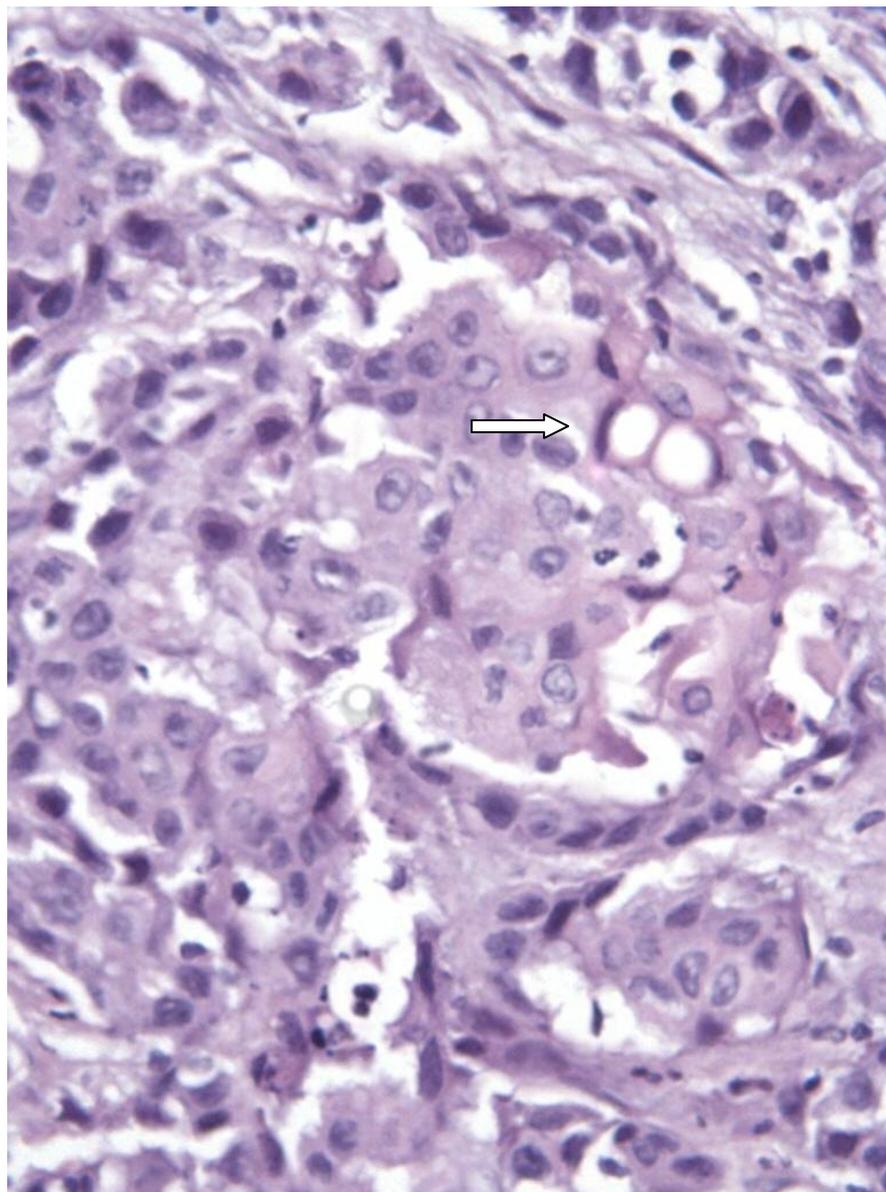


FIGURA 61 - CCT com diferenciação oxifilica. Células com citoplasma abundante eosinofílico. Observa-se diferenciação glandular com células bigeminadas em anel de sinete (seta), (Grupo X - Rato 3). Cortes histopatológicos de lesões vesicais corados pela HE.

4.3.7.1 - Índice de carcinogênese

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 17).

TABELA 17: Índice de carcinogênese obtido após somatório dos escores por rato e por grupo:

| Grupo | Rato Nº efetivo De animais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | Média | Desvio Padrão |
|-------|-------------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|-----|-----|----|----|--------|------------------|
| | | I | 10 | 18 | 15 | 18 | 36 | 36 | 18 | 18 | 18 | 15 | 18 | | | |
| IIA | 07 | 39 | 18 | 15 | 18 | 18 | 60 | 18 | | | | | | | 26,571 | 16,831 |
| IIB | 06 | 15 | 15 | 26 | 9 | 9 | 9 | | | | | | | | 13,833 | 06,645 |
| III | 17 | 18 | 18 | Ex | 95 | 30 | 64 | 15 | 72 | 18 | 42 | | | | 40,471 | 24,436 |
| | | 60 | 18 | 72 | 18 | Ex | 34 | 48 | Ex | 24 | 42 | | | | | |
| X | 05 | 66 | 93 | 81 | 60 | 54 | Ex | | | | | | | | 70,800 | 15,959 |
| K | 12 | 18 | 63 | Ex | 72 | 36 | 15 | 26 | 15 | 18 | 54 | 48 | 63 | 48 | 39,667 | 20,965 |
| L | 09 | 48 | 83 | 15 | Ex | 63 | 15 | Ex | Ex | 36 | 48 | 123 | 30 | | 51,222 | 34,691 |
| M | 10 | 90 | 48 | 15 | 33 | 78 | Ex | 108 | 72 | 78 | 36 | 66 | Ex | | 62,400 | 28,768 |
| N | 12 | 90 | 15 | 48 | 90 | Ex | 26 | 18 | 18 | 81 | 102 | 123 | 15 | 54 | 56,667 | 39,028 |

*1 Índice máximo alcançado por bexiga. Lesão benigna em preto e lesão maligna em vermelho.

*2 Ex - excluído

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 62)

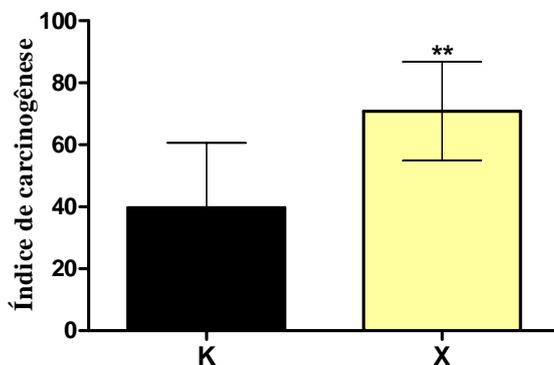


FIGURA 62 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K e X. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K e 5 ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo X ($70,800 \pm 15,959$) foi significativamente maior (** $P = 0,0097$) que o mensurado no grupo K ($39,667 \pm 20,965$).

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 63). Observa-se na Tabela 17 os parâmetros utilizados.

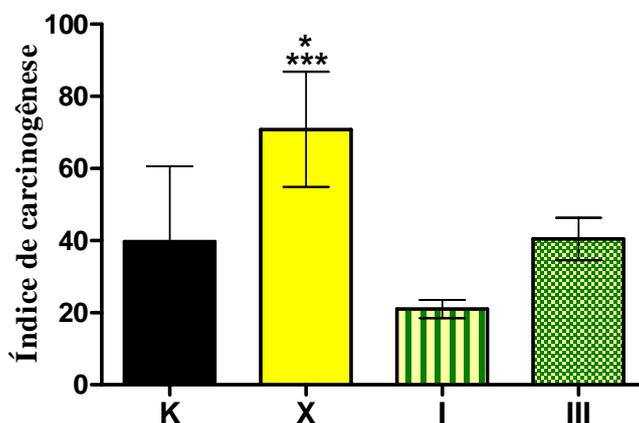


FIGURA 63 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K, X, I e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, 5 do grupo X, 10 do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada 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 ($40,471 \pm 24,436$; $P < 0,05$).

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 64)

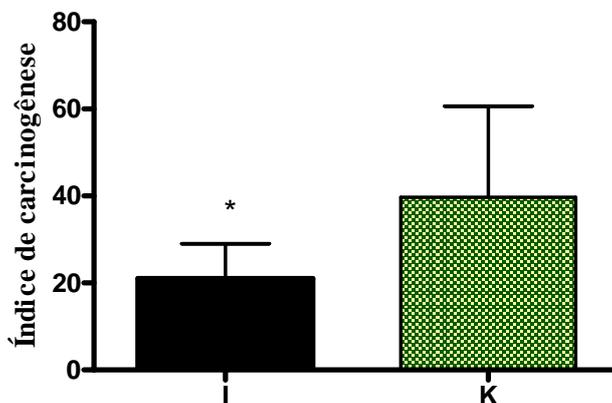


FIGURA 64 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e K. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 10 animais do grupo I e 12 ratos do grupo K. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo I (21,000 ± 8,000) foi significativamente menor que o mensurado no grupo K (39,667 ± 20,965; $P = 0,0153$).

Ao avaliar o índice de carcinogênese dos grupos I e III, constatou-se que o grupo I obteve menor índice de carcinogênese estatisticamente significativa em relação ao grupo K (Figura 65)

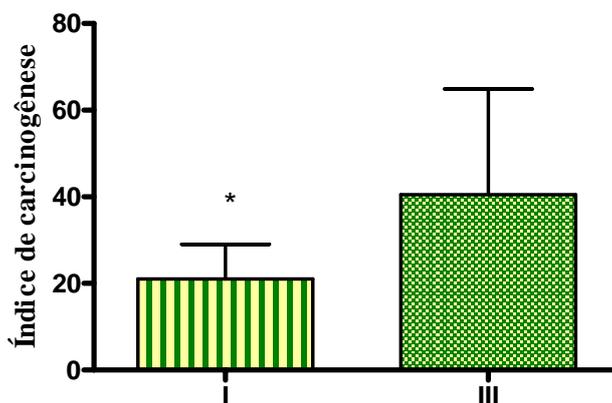


FIGURA 65 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos I e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 10 animais do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Constatou-se que o índice de carcinogênese verificado no grupo I (21,000 ± 8,000) foi significativamente menor que o mensurado nos grupos III (40,471 ± 24,436; $P = 0,022$).

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 66).

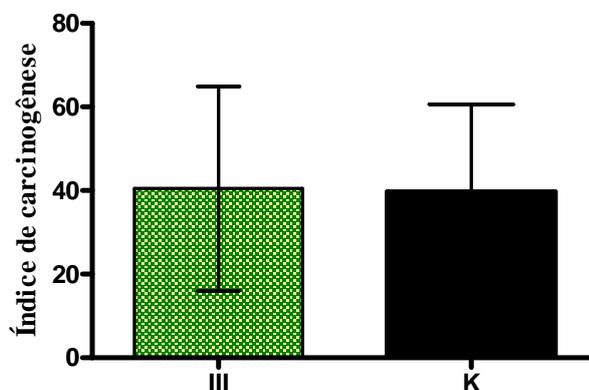


FIGURA 66 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos III e K. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 17 animais do grupo III e 12 ratos do grupo K. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos III ($40,471 \pm 24,435$) e K ($39,667 \pm 20,965$; $P=0,927$).

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 67).

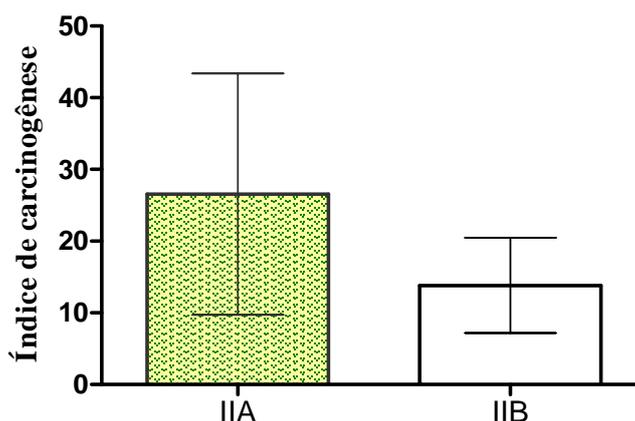


FIGURA 67 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e IIB. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 6 ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1110$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e IIB ($13,833 \pm 6,646$).

Na comparação dos grupos IIA e III, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes com relação ao índice de carcinogênese. (Figura 68)

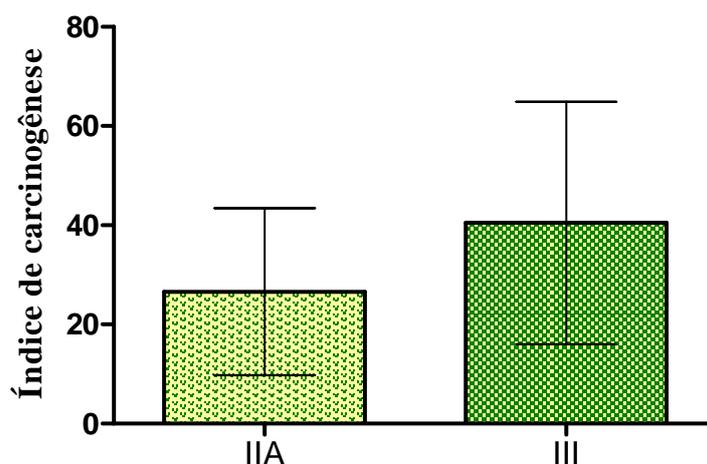


FIGURA 68 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos IIA e III. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram feitas pelo Teste *t* para variáveis não emparelhadas. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,1850$) entre os grupos IIA ($26,571 \pm 16,831$) e III ($40,471 \pm 24,436$).

E, por fim, avaliando-se os índices de carcinogênese dos grupos K, L, M, N, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre eles (Figura 69).

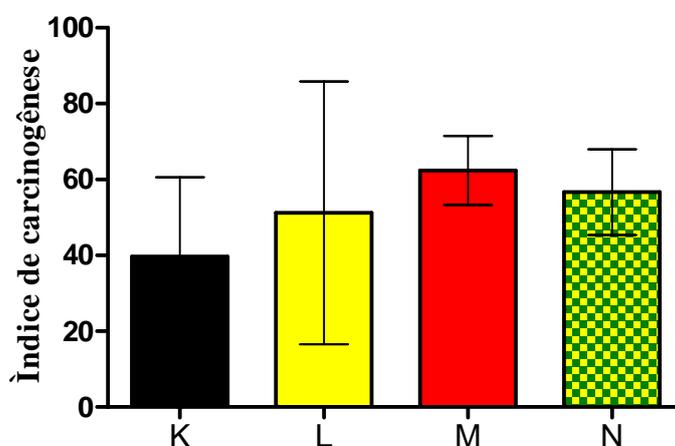


FIGURA 69 – Avaliação do índice de carcinogênese nos grupos K, L, M e N. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, 9 do grupo L, 10 do grupo M e 12 ratos do grupo N. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada 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.

4.3.7.2 Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas:

Incidência de Hiperplasias, Papilomas, Lesão de Baixo Potencial Maligno e Carcinomas (Tabela 18).

TABELA 18 - Evolução da carcinogênese ao final de 40 semanas: Incidência de Hiperplasias, Papilomas, Lesão de Baixo Potencial Maligno e Carcinomas.

| Grupo | Tratamento | Nº Efetivo de ratos | Histopatologia Incidência (%) | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------|-----|--------|------|-----------|----|--------|----|-------|----|--------|
| | | | HPS | HPP | HPN | PAP | LBPM | CARCINOMA | | | | | | |
| I | BBN/P/L P 1 mês antes | 10 | 8 | 80,00 | 9 | 90,00 | 2 | 20,00 | 9 | 90,00 | 6 | 60,00 | 2 | 20,00 |
| IIA | BBN/P/L Subcutâneo | 07 | 5 | 71,42 | 5 | 71,42 | 2 | 28,57 | 5 | 71,42 | 4 | 57,14 | 2 | 28,57 |
| IIB | BBN/H ₂ O Subcutâneo | 06 | 6 | 100,00 | 5 | 83,33 | 0 | 00,00 | 4 | 66,66 | 0 | 00,00 | 1 | 16,66 |
| III | BBN/P/L intragástrica | 17 | 15 | 88,23 | 15 | 88,23 | 7 | 41,17 | 16 | 94,11 | 13 | 74,47 | 11 | 64,71 |
| X | BBN/L intragástrica | 5 | 4 | 80,00 | 3 | 60,00 | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 3 | 60,00 | 5 | 100,00 |
| K | BBN | 12 | 10 | 83,33 | 10 | 83,33 | 5 | 41,66 | 9 | 75,00 | 3 | 25,00 | 8 | 66,66 |
| L | BBN/LL | 9 | 8 | 88,88 | 7 | 77,77 | 3 | 33,33 | 8 | 88,88 | 1 | 11,11 | 7 | 77,77 |
| M | BBN/Cel | 10 | 10 | 100,00 | 10 | 100,00 | 7 | 70,00 | 10 | 100,00 | 4 | 40,00 | 9 | 90,00 |
| N | BBN/PP/LL | 12 | 10 | 83,33 | 11 | 91,66 | 4 | 33,33 | 10 | 83,33 | 6 | 50,00 | 8 | 66,66 |

Nº número; HPS - Hiperplasia simples; HPP - Hiperplasia papilar; HPN- Hiperplasia nodular; PAP – Papiloma; L.B.P.M. - Lesão de baixo potencial maligno; 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.

4.3.7.3 Avaliação estatística da incidência de carcinoma de bexiga.

As avaliações estatísticas a seguir correspondem aos dados brutos obtidos da tabela anterior (Tabela 18).

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 19 e 20).

TABELA 19 – 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 |

TABELA 20 – 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 |

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 (Tabelas 21).

TABELA 21 – 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 |

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 22 a 27).

TABELA 22 – 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 |

TABELA 23 – 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 |

TABELA 24 – 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 |

TABELA 25 – 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 |

TABELA 26 – 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 |

TABELA 27 – 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 |

4.3.7.4 Avaliação da multiplicidade de carcinoma: (Número de carcinomas por bexiga)

Os dados utilizados nesta avaliação encontram-se na Tabela 28 e se referem à invasão de parede e à atipia celular.

TABELA 28 - Multiplicidade de carcinomas (Número de carcinomas por bexiga) com classificação por invasão e atipias

| Grupo | Tratamento | Nº EFETIVO ratos | Nº (%) RATOS COM CARCINOMAS | NÚMERO DE CARCINOMAS (%) | | | | | | |
|-------|------------------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------|------------|---------------------------|------------|
| | | | | MULTIPLICIDADE Nº de carcinomas por rato mediana (min-max) | TOTAL DE CARCINOMAS | Classificação por invasão | | | Classificação por atipias | |
| | | | | | | SM | MUS | S/P/M | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| I | BBN/P/L P 1 mês antes | 10 | 2 020,00 | 0 (0-1) | 02 | 1 (50,00) | 1 (50,00) | 0 (0) | 1 (50,00) | 1 (50,00) |
| IIA | BBN/P/L Subcutâneo | 07 | 2 028,57 | 0 (0-2) | 03 | 2 (66,66) | 1 (33,33) | 0 (0) | 1 (33,33) | 2 (66,66) |
| IIB | BBN/H ₂ O Subcutâneo | 06 | 1 016,60 | 0 (0-2) | 02 | 2 (100,00) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (100,00) | 0 (0) |
| III | BBN/P/L intragástrica | 17 | 11 064,70 | 1(0-5) | 26 | 13 (50,00) | 6 (23,07) | 7 (26,92) | 6 (23,07) | 20 (76,92) |
| X | BBN/L intragástrica | 05 | 5 100,00 | 4 (1-6) | 17 | 05 (29,41) | 1 (05,88) | 11 (64,70) | 6 (35,29) | 11 (64,70) |
| K | BBN | 12 | 8 066,67 | 1 (0-4) | 14 | 09 (64,28) | 4 (28,57) | 1 (7,14) | 3 (21,42) | 11 (78,57) |
| L | BBN/LL | 09 | 7 077,77 | 1 (0-4) | 12 | 04 (33,33) | 4 (33,33) | 4 (33,33) | 1 (08,33) | 11 (91,66) |
| M | BBN/Cel | 10 | 9 090,00 | 2 (0-5) | 21 | 07 (33,33) | 7 (33,33) | 7 (33,33) | 3 (14,28) | 18 (85,71) |
| N | BBN/PP/LL | 12 | 8 066,66 | 1 (0-4) | 17 | 05 (29,41) | 4 (23,52) | 8 (47,05) | 3 (17,64) | 14 (82,35) |

G - Grupo, Nº Número, 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, PLL- Dupla dose de própolis extraída em lisina, Cel – celecoxibe.

Os dados analisados estatisticamente encontram-se na Tabela 28 e se referem à invasão de parede e à atipia celular. Em apêndice, demais tabelas por bexiga e por grupo - Apêndice F1). Os dados não obedeceram à curva de distribuição normal, sendo avaliados estatisticamente como dados não paramétricos.

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 70).

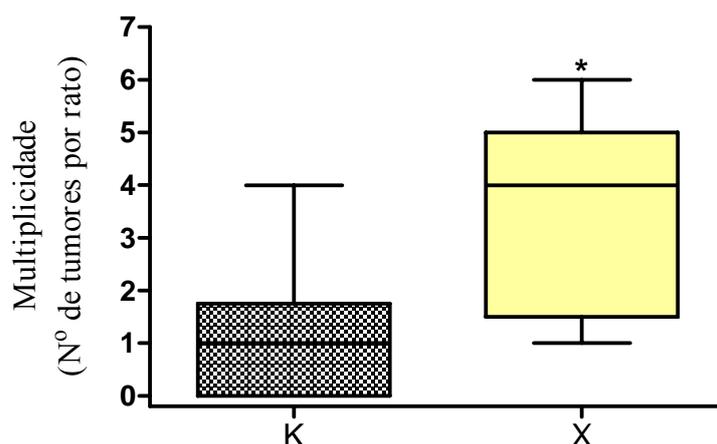


FIGURA 70 – Avaliação da multiplicidade de Carcinomas nos grupos K e X. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K e 5 ratos do grupo X. Comparações entre os dois grupos foram feitas 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).

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 71).

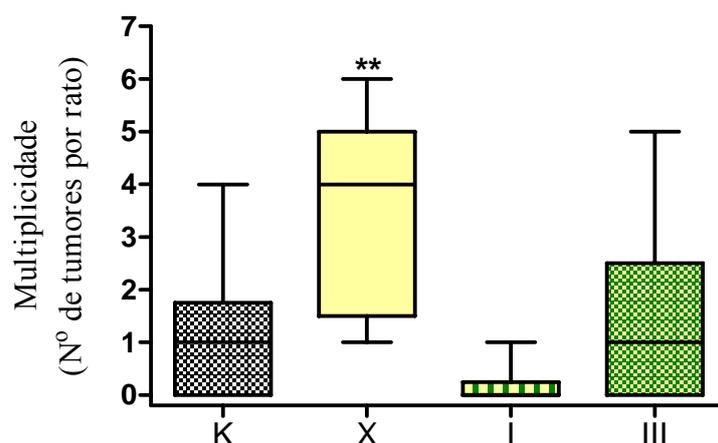


FIGURA 71 – Avaliação da multiplicidade de C nos grupos K, X, I e III. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, 5 do grupo X, 10 do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações entre 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.

Os parâmetros utilizados para comparação da multiplicidade de C (número de carcinomas por bexiga) dos grupos K, X, I e III estão na Tabela 29:

Tabela 29- Parâmetros utilizados para 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 |

Na avaliação de multiplicidade de carcinomas comparativa entre os grupos IIA e IIB, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, conforme observado na Figura 72.

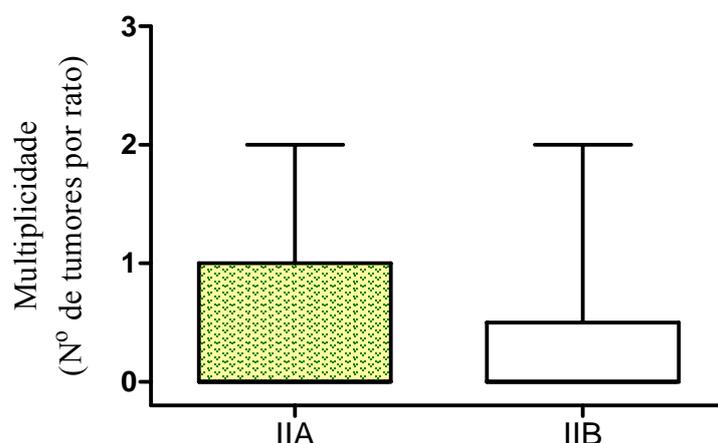


FIGURA 72 – Avaliação da multiplicidade de carcinomas nos grupos IIA e IIB. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 6 ratos do grupo IIB. Comparações entre os dois grupos foram 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).

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 73 e 74.

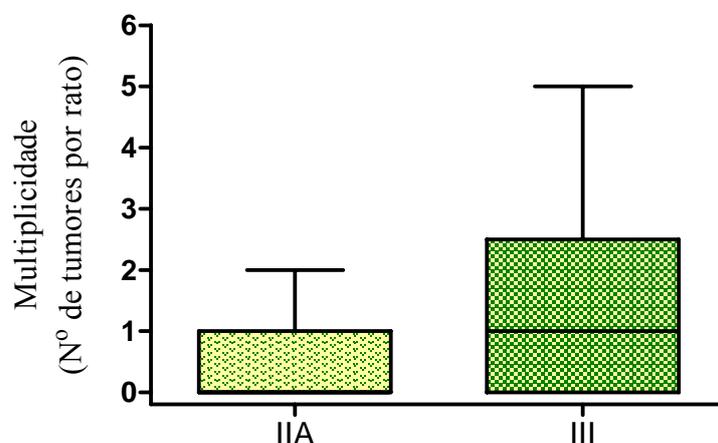


FIGURA 73 – Avaliação da multiplicidade de carcinoma nos grupos IIA e III. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 7 animais do grupo IIA e 17 ratos do grupo III. Comparações entre os dois grupos foram 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).

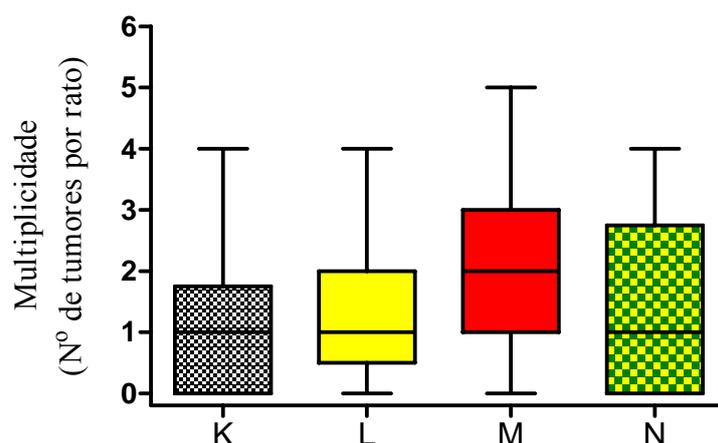


FIGURA 74 – Avaliação da multiplicidade de carcinomas nos grupos K, L, M e N. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75) e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 12 animais do grupo K, 5 do grupo X, 10 do grupo I e 17 ratos do grupo III. Comparações 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; $P = 0,3308$).

Os valores dos parâmetros utilizados na comparação quanto à multiplicidade de C entre os grupos K, L, M e N estão na Tabela 30.

TABELA 30 - 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 |

4.3.7.5 Grau de invasão

Nesta avaliação foram utilizados os dados absolutos obtidos de todos os carcinomas presentes em cada bexiga, por grupo, Tabela 28, cujos detalhes estão no Apêndice F1.

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 31).

TABELA 31 – 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 |

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 32).

TABELA 32 – 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 |

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 33 a 36).

TABELA 33 – 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 |

TABELA 34 – 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 |

TABELA 35 – 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 |

TABELA 36 – 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 |

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 37)

TABELA 37 – 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 |

4. 3.7.6 Grau de Atipias

Nesta avaliação foram utilizados os dados de número de carcinomas existentes em cada bexiga por grupo (Tabela 28).

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 (Tabelas em apêndices F2).

4.3. 7. 6 Grau de diferenciação:

TABELA 38 - Multiplicidade de carcinomas (Número de carcinomas por bexiga) com classificação por diferenciação e subtipos histopatológicos

| G | Tratamento | Nº EFETIVO ratos | Nº (%) RATOS COM CARCINOMAS | | TOTAL DE CARCINOMAS | CARCINOMAS Nº % | | | | |
|-----|------------------------------------|------------------|-----------------------------|--------|---------------------|---------------------------------|------------|------------|---------------------------|------------|
| | | | | | | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
| | | | | | | BD | MD | IND | CCT Puro | OUTROS |
| I | BBN/P/L P 1 mês antes | 10 | 2 | 020,00 | 02 | 01 (50,00) | 01 (50,00) | 0 (0) | 01 (50,00) | 01 (50,00) |
| IIA | BBN/P/L Subcutâneo | 07 | 2 | 028,57 | 03 | 01 (33,33) | 0 (0) | 02 (66,66) | 02 (66,66) | 01 (33,33) |
| IIB | BBN/H ₂ O Subcutâneo | 06 | 1 | 016,60 | 02 | 02 (100,00) | 0 (0) | 0 (0) | 02 (100,00) | 0 (0) |
| III | BBN/P/L intragástrica | 17 | 11 | 064,70 | 26 | 06 (23,07) | 06 (23,07) | 14 (53,84) | 14 (53,84) | 12 (46,15) |
| X | BBN/L intragástrica | 05 | 5 | 100,00 | 17 | 01 (05,88) | 11 (64,70) | 05 (29,41) | 04 (23,52) | 13 (76,47) |
| K | BBN | 12 | 8 | 066,67 | 14 | 02 (64,28) | 08 (28,57) | 04 (28,57) | 4 (28,57) | 10 (71,42) |
| L | BBN/LL | 09 | 7 | 077,77 | 12 | 0(0) | 08 (66,66) | 04 (33,33) | 1 (08,33) | 11 (91,66) |
| M | BBN/Cel | 10 | 9 | 090,00 | 21 | 03(14,28) | 10 (47,61) | 08 (38,09) | 02 (09,52) | 19 (90,47) |
| N | BBN/PP/LL | 12 | 8 | 066,66 | 17 | 0(0) | 10(58,82) | 07(41,17) | 06 (35,29) | 11 (64,70) |

G - Grupo, Nº Número, BD- Bem diferenciado, MD- Moderadamente diferenciado, IND- Indiferenciado, 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 - Celecoxibe.

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, como carcinomas de células transicionais puro e outros, pelo teste exato de Fisher.

Nesta análise foram utilizados os dados do número de carcinomas presentes em cada bexiga, por grupo (Tabela 38). Avaliação por tumor por bexiga e por grupo- Apêndice F2).

Desta avaliação apenas dois grupos, quando comparados, mostraram diferenças estatisticamente significante, o Grupo X com o grupo III (Tabela 39). As demais comparações não evidenciaram diferenças estatísticas significantes (Tabelas em apêndices F4).

TABELA 39 - 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 significante (** $P = 0,0206$) entre os grupos X e III em relação ao grau de diferenciação hitopatológica. 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 |

4.3.7.8 Subtipos histopatológicos de carcinomas

Os dados analisados estatisticamente encontram-se na Tabela 38.

Avaliação por tumor, por bexiga e por grupo em Apêndice F3.

Para esta avaliação estatística, foram excluídos os grupos I, IIA e IIB devido à pequena incidência e à diminuta multiplicidade de carcinomas (2 em I, 3 em IIA e 2 em IIB), o que prejudicaria a comparação proporcional entre os grupos.

Nenhum dos grupos comparados apresentou diferença estatística significativa quanto aos subtipos histopatológicos considerandos como CCT puro e outros (Tabelas em apêndice F5).

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 oxifílica; 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 40); número de subtipos histológicos de carcinomas por grupo (Tabela 41); número de bexigas com 1, 2, 3, 4 e 5 carcinomas (Tabela 42); correlação subtipo histológico de carcinomas x invasão da parede vesical (Tabela 43); correlação do subtipo histológico de carcinomas x diferenciação histológica e atipias (Tabela 44).

TABELA 40- Número de ratos com subtipos histológicos de carcinomas.

| | | ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS CARCINOMAS | | | | | | | | | | | |
|-------|----|----------------------------------------------------------|--------|---------------|-----------|------|----------------------|-----------|--------------|------------------------|-----------|------|--------------|
| Grupo | N | NÚMEROS DE RATOS COM SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMAS | | | | | | | | | | | |
| | | Número de Ratos com carcinomas Nº, % | | 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 | 20,00 | 1 (50,00) | 0 | 0 | 1 (50,00) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IIA | 07 | 2 | 28,57 | 1 (50,00) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (50,00) | 0 | 0 |
| IIB | 06 | 1 | 16,60 | 1 (100,00) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| III | 17 | 11 | 64,70 | 5 (45,45) | 1 (9,09) | 0 | 5 (45,45) | 0 | 0 | 0 | 1 (9,09) | 0 | 1 (9,09) |
| X | 5 | 5 | 100,00 | 2 (40,00) | 1 (20,00) | 0 | 4 (80,00) | 1 (20,00) | 0 | 0 | 1 (20,00) | 0 | 0 |
| XI | 6 | 0 | 00,00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| XII | 6 | 0 | 00,00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| XIII | 6 | 0 | 00,00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| K | 12 | 8 | 66,67 | 3 (37,50) | 1 (12,50) | 0 | 2 (25,00) | 1 (12,50) | 0 | 1 (12,50) | 2 (25,00) | 0 | 0 |
| L | 9 | 7 | 77,77 | 2 (28,57) | 1 (14,28) | 0 | 4 (57,14) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M | 10 | 9 | 90,00 | 2 (22,22) | 2 (22,22) | 0 | 6 (66,66) | 0 | 1 (11,11) | 3 (33,33) | 1(11,11) | 0 | 0 |
| N | 12 | 8 | 66,66 | 4 (50,00) | 5 (62,50) | 0 | 1(12,50) | 0 | 0 | 1 (12,50) | 1 (12,50) | 0 | 0 |

N – Nne, 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/ADEN- Escamoso/adenocarcinoma .

TABELA 41 - Número de subtipos histológicos de carcinomas por grupo

| Grupo | N | Nº de ratos com carcinomas | Nº de Carcinomas 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 |

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 42 - Número de bexigas com 1,2, 3, 4 e 5 carcinomas

| Grupo | N | Número carcinomas por grupo N° | 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 |

N – Ene, N° - Número

TABELA 44 - Correlação do subtipo histológico de carcinomas x diferenciação histológica e atipias

| | | NÚMERO DE TUMORES (SUBTIPOS HISTOLÓGICO DE CARCINOMAS) X DIFERENCIAÇÃO E ATIPIAS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|------|------|------------|---------------------------|-----------------------------|------|----------|---------|---------------------------|-----------------------------|------|------|-----------|---------------------------|-----------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| G | Nº de carcinomas | PURO | | | | | CCT C/DIF. | | | | | | MISTO: CCT + | | | | | | | | | | | | | | |
| | | CCT | | ESC | | | ESC | | GLAN | | ESC/GLAN | | PSEUDO/GLAN | | ESC | | ESC/ADENO | | | | | | | | | | |
| | | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | DIFE | ATIP | | | | | | | | |
| | | D I F E | M O D E R A D A M E N T E | I N D I F E R E N C I A D O | B A | A | D I F E | M O D E R A D A M E N T E | I N D I F E R E N C I A D O | B A | A | D I F E | M O D E R A D A M E N T E | I N D I F E R E N C I A D O | B A | A | D I F E | M O D E R A D A M E N T E | I N D I F E R E N C I A D O | B A | A | | | | | | |
| I | 2 | 1 | | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IIA | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | 1 | | | | | |
| IIB | 1 | | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| III | 26 | 1 | 4 | 6 | 3 | 8 | 3 | | 3 | 2 | 2 | 3 | | 7 | | | | | | 2 | 2 | | 4 | | 1 | 1 | |
| X | 17 | 1 | 1 | 2 | 1 | 3 | | | | 7 | 2 | 4 | 5 | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | 2 | | 2 | | | | |
| K | 14 | | 3 | 1 | | 4 | 1 | | | 3 | | | 3 | | | 1 | 2 | 3 | | 1 | 1 | 1 | 2 | | | | |
| L | 12 | | 1 | 1 | | 2 | 3 | 3 | | 4 | 3 | | 1 | 6 | | | | | | | | | | | | | |
| M | 21 | | | 2 | | 2 | 1 | 2 | | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 7 | 1 | | 1 | | | 2 | 1 | 1 | 2 | | 1 | 1 |
| N | 17 | | 4 | 2 | 1 | 5 | 4 | 4 | 1 | 7 | | | | | | | | | | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

Nº Número, G- Grupo, CCT - Carcinoma de células transicionais, ESC- Escamoso, ADEN- Adenocarcinoma, CCT C/DIF - Carcinoma de células transicionais com diferenciação, ESC –Escamoso, GLAN- Glandular, ESC/GLAN- Escamoso/ glandular, PSEUDO/GLAN- Pseudoglandular, ESC/ADEN- Escamoso/adenocarcinoma, DIFE- Diferenciação, Dif- Diferenciado, Mod – Moderadamente diferenciado, Ind-Indiferenciado, ATIP- Atipias.

4.3. 8 Avaliação macroscópica e histopatológica para carcinogênese de ratos que foram a óbito entre a 1ª e 31ª semana (excluídos do estudo)

A necropsia evidenciou bexigas com tumorações multifocais delicadas, de vários tamanhos, semelhantes a couve-flor rósea. Uma das bexigas apresentava lesão tumoral de 2,5 cm em seu maior diâmetro, pediculada infiltrante, com invasão da parede até a serosa (Figura 75). Vários estágios evolutivos da carcinogênese vesical foram identificado e, muitas vezes, em uma só bexiga. A Tabela 45 sintetiza, em dados, a lesão histopatológica de maior grau evolutivo na carcinogênese, observada em cada bexiga.

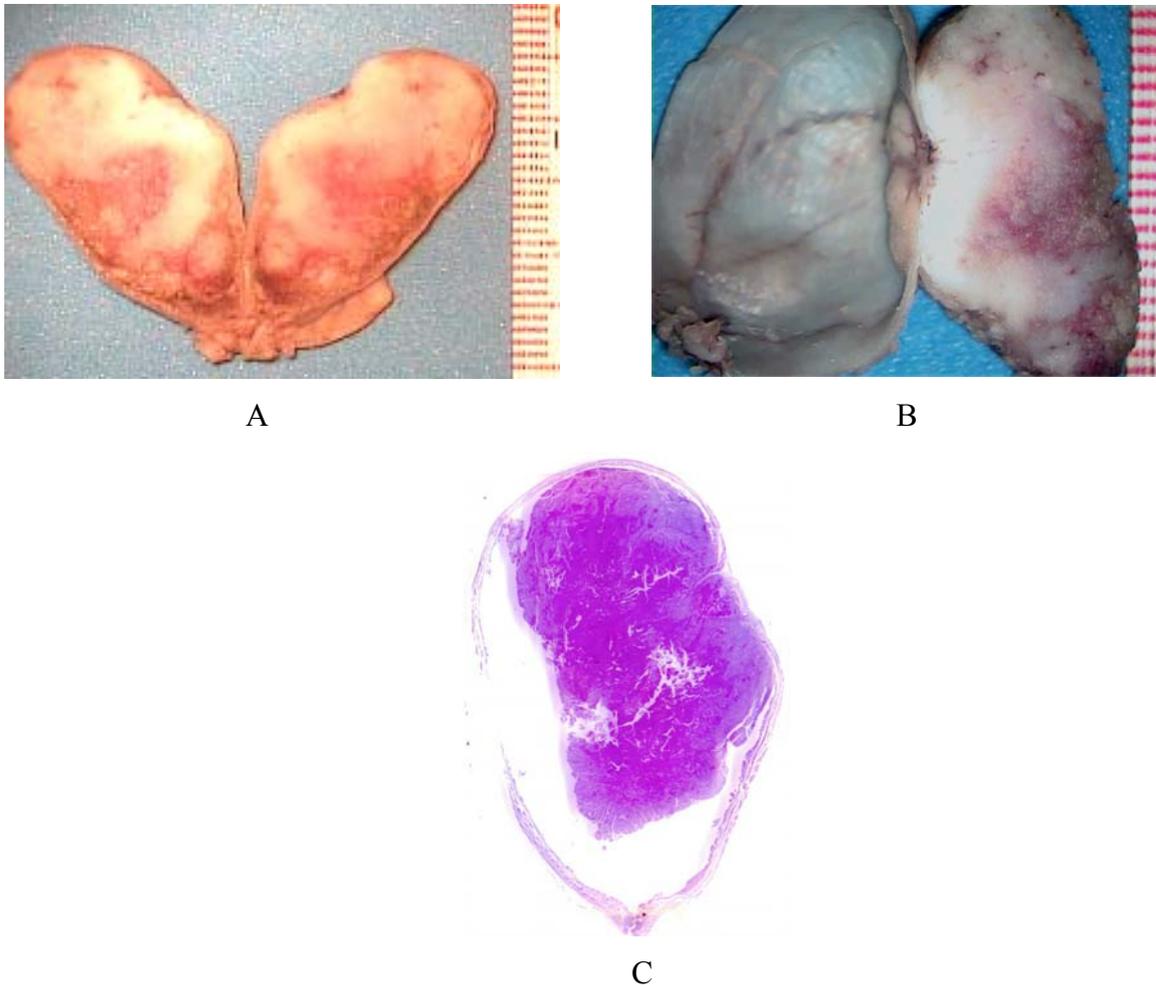


FIGURA 75 A e B- Bexiga fixada em formol a 10% apresentando lesão tumoral pediculada infiltrando a parede vesical até a serosa que ocupa quase completamente a luz vesical medindo 2,5 x 1,5 x 1,4 cm. A superfície de corte é sólida, cirrótica em proximidade do pedículo e necrótica em superfície da luz vesical; C - Cortes histopatológico em dois níveis da bexiga, corados pelo HE - Lâmina escaneada (Escâner HP®) Grupo VI Rato 5.

TABELA 45 - Lesões histopatológicas de maior grau evolutivo na carcinogênese observadas em cada bexiga dos ratos que morreram entre a 21^a e a 31^a semana

| Lesões de maior grau evolutivo de carcinogênese de bexigas entre 21 ^a a 31 ^a semana | Nº de bexigas | % |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----|
| Hiperplasia simples | 2 | 20 |
| Papilomas | 4 | 40 |
| Lesão de Baixo Potencial Maligno | 1 | 10 |
| Carcinoma de Células Transicionais | 3 | 30 |
| Total | 10 | 100 |

4.3.9 Resultado da quantificação e estatística da angiogênese.

A imunohistoquímica realizada seguiu o protocolo estabelecido em materiais e métodos. A coloração marrom revelada pela captação do anticorpo, conforme pode ser vista na Figura 76, foi quantificada através da densidade microvascular (DM).

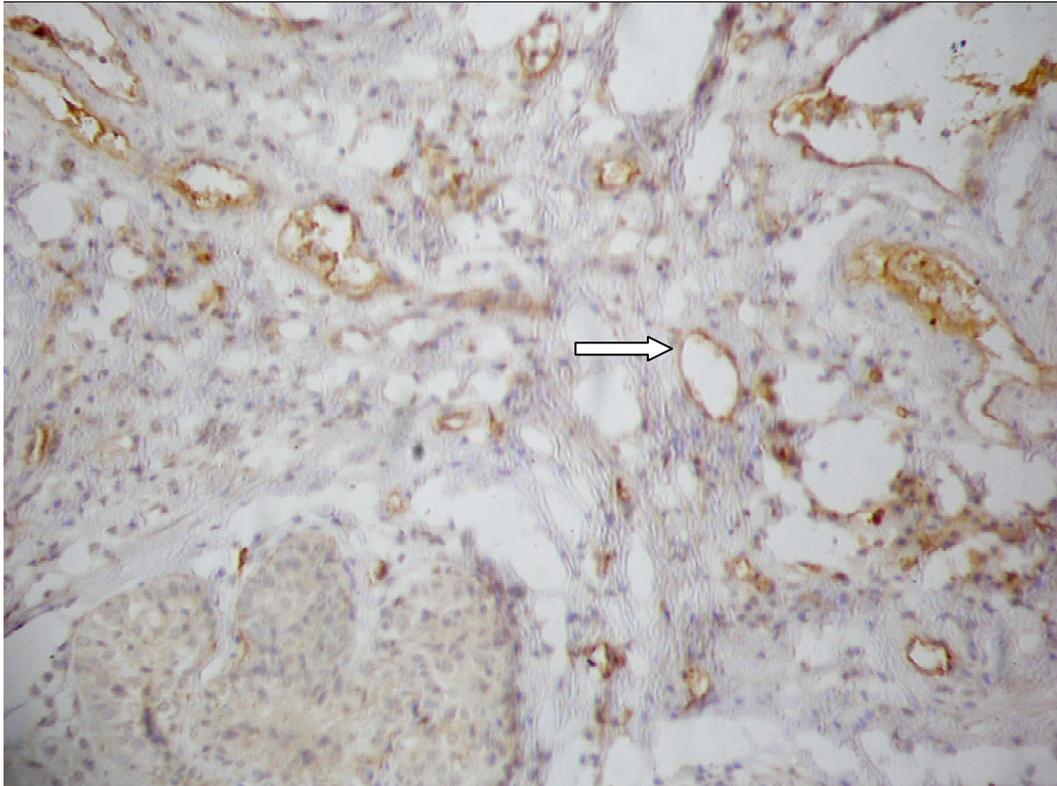


FIGURA 76 - Corte histopatológico de carcinoma de células transicionais com diferenciação oxifílica (Grupo X rato 3) , observam-se em *hot spots* vasos (seta) e células imunocoradas em marrom (positivo para CD 31) contracorado pela hematoxilina de Carazzi 200 x.

A densidade de cada campo foi calculada pelo SAMM e apresentada como densidade de área, conforme se observa na tabela 46. Os valores de DM para cada imagem da área selecionada, área segmentada e densidade de área de 3 imagens tumorais, por bexiga e por grupo, encontram-se no Apêndice G.

TABELA 46 - Densidade Microvascular pela densidade de área calculada pelo SAMM

| GRUPO K | DENS | GRUPO L | DENS | GRUPO M | DENS | GRUPO N | DENS | GRUPO X | DENS | GRUPO III | DENS |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|-----------|--------|
| KK2 | 0,0823 | LL1 | 0,0954 | MM2 | 0,0621 | NN1 | 0,0731 | XX1 | 0,1014 | III III4 | 0,0744 |
| KK2 | 0,0926 | LL1 | 0,1057 | MM2 | 0,0965 | NN1 | 0,0604 | XX1 | 0,1038 | III III4 | 0,6221 |
| KK2 | 0,0744 | LL1 | 0,0879 | MM2 | 0,0492 | NN1 | 0,0840 | XX1 | 0,0941 | III III4 | 0,0534 |
| KK4 | 0,0803 | LL2 | 0,0788 | MM5 | 0,0806 | NN3 | 0,0671 | XX2 | 0,1326 | III III6 | 0,0709 |
| KK4 | 0,1187 | LL2 | 0,0889 | MM5 | 0,0957 | NN3 | 0,0442 | XX2 | 0,1115 | III III6 | 0,0634 |
| KK4 | 0,0731 | LL2 | 0,1210 | MM5 | 0,0779 | NN3 | 0,0607 | XX2 | 0,1207 | III III6 | 0,0697 |
| KK5 | 0,0832 | LL9 | 0,0719 | MM7 | 0,0812 | NN6 | 0,0606 | XX3 | 0,1254 | III III8 | 0,0640 |
| KK5 | 0,0610 | LL9 | 0,0944 | MM7 | 0,1062 | NN6 | 0,0945 | XX3 | 0,1103 | III III8 | 0,0478 |
| KK5 | 0,0663 | LL9 | 0,0821 | MM7 | 0,0618 | NN6 | 0,0521 | XX3 | 0,1520 | III III8 | 0,0594 |
| KK10 | 0,0701 | LL10 | 0,0680 | MM8 | 0,0754 | NN9 | 0,0761 | XX4 | 0,1367 | III III9 | 0,0633 |
| KK10 | 0,0974 | LL10 | 0,0783 | MM8 | 0,0699 | NN9 | 0,0620 | XX4 | 0,0861 | III III9 | 0,0656 |
| KK10 | 0,0818 | LL10 | 0,1001 | MM8 | 0,0542 | NN9 | 0,0222 | XX4 | 0,1513 | III III9 | 0,0614 |
| KK11 | 0,0880 | LL11 | 0,0472 | MM11 | 0,0597 | NN10 | 0,0692 | XX5 | 0,0993 | III III11 | 0,0783 |
| KK11 | 0,1010 | LL11 | 0,0827 | MM11 | 0,0983 | NN10 | 0,0569 | XX5 | 0,1319 | III III11 | 0,0789 |
| KK11 | 0,1080 | LL11 | 0,0666 | MM11 | 0,0453 | NN10 | 0,0563 | XX5 | 0,1204 | III III11 | 0,0574 |
| KK12 | 0,1100 | | | | | | | | | | |
| KK12 | 0,1233 | | | | | | | | | | |
| KK12 | 0,0840 | | | | | | | | | | |

Foram realizadas comparações entre os grupos, com dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em triplicatas, em 6 animais do grupo K e 5 ratos dos grupos L, M, N, X e 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.

Comparando os grupos K, L, M e N, constatou-se que a densidade microvascular verificada no grupo N foi significativamente menor que a mensurada nos grupos K (** $P < 0,01$) e L (* $P < 0,05$) (Figura 77 e Tabela 47).

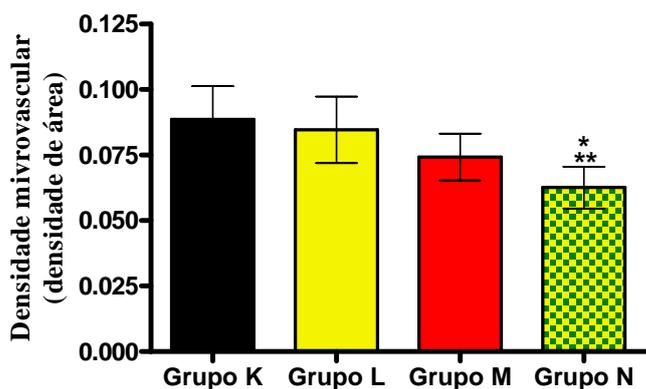


FIGURA 77 – Comparação da densidade microvascular nos grupos K, L, M e N. A densidade microvascular no grupo N foi menor que nos grupos K (** $P < 0,01$) e L (* $P < 0,05$), ANOVA e Tukey.

TABELA 47 - Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, L, M e N.

| Parâmetros | K | L | M | N |
|---------------|--------|--------|--------|--------|
| Média | 0,0886 | 0,0845 | 0,0742 | 0,0626 |
| Desvio Padrão | 0,0127 | 0,0127 | 0,0088 | 0,0079 |

Na comparação dos grupos K, X e III, observou-se que a densidade microvascular verificada no grupo X foi significativamente maior que a mensurada nos grupos K (** $P < 0,01$) e III (***) ($P < 0,001$). Por outro lado, a densidade microvascular observada no grupo III foi significativamente menor que a verificada nos grupo K (++) ($P < 0,01$) (Figura 78 e Tabela 48).

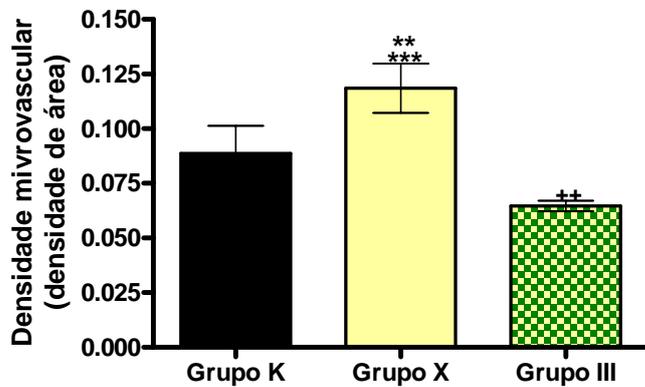


FIGURA 78 – Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, X e III. No grupo X foi maior que nos grupos K (** $P < 0,01$) e III (***) ($P < 0,001$). No grupo III foi menor que a verificada em K (++) ($P < 0,01$), ANOVA e Tukey.

TABELA 48 – Parâmetros utilizados para comparação dos grupos X, K e III

| Parâmetros | X | K | III |
|---------------|--------|--------|--------|
| Média | 0,1185 | 0,0886 | 0,0646 |
| Desvio padrão | 0,0113 | 0,0127 | 0,0054 |

A comparação dos grupos K, L e X revela a ação da lisina na densidade microvascular. Observada em duas doses e tempos distintos, constatou-se que a densidade microvascular verificada no grupo X foi significativamente maior (** $P < 0,01$) que a mensurada nos grupos K e L (Figura 79 e Tabela 49).

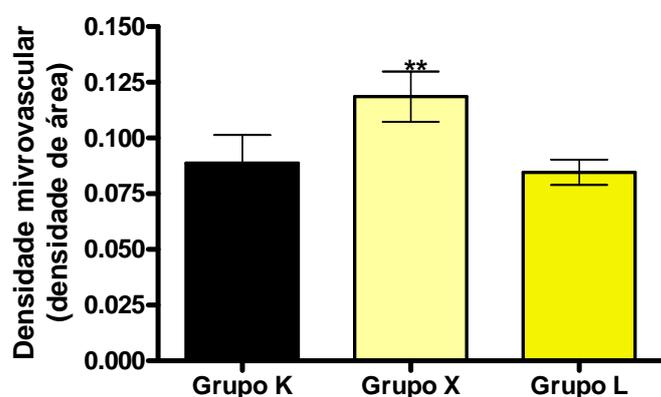


FIGURA 79 - Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, X e L. No grupo X foi significativamente maior (** $P < 0,01$) que a mensurada nos grupos K e L, ANOVA e Tukey.

TABELA 49 - Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, X e L

| Parâmetros | K | X | L |
|---------------|--------|--------|--------|
| Média | 0,0886 | 0,1185 | 0,0846 |
| Desvio padrão | 0,0127 | 0,0113 | 0,0127 |

Comparando-se os grupos K, N e III, pode-se observar a ação da própolis (WSDP) na densidade microvascular. Investigada em doses e tempos distintos, constatou-se que a densidade microvascular verificada no grupo K foi significativamente maior que a mensurada nos grupos N (** $P < 0,01$) e III (++ $P < 0,01$) (Figura 80, Tabela 50).

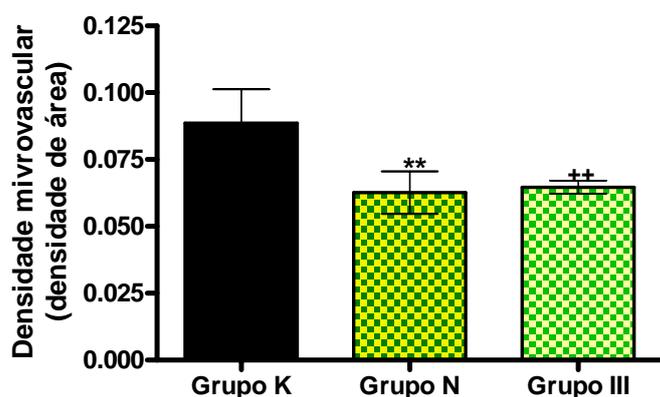


FIGURA 80: Comparação da densidade microvascular entre os grupos K, N e III. No grupo K foi maior que nos grupos N (** $P < 0,01$) e III (++ $P < 0,01$), ANOVA e Tukey.

TABELA 50 - Parâmetros utilizados para comparação dos grupos K, N e III

| Parâmetros | K | N | III |
|---------------|--------|--------|--------|
| Média | 0,0886 | 0,0626 | 0,0646 |
| Desvio Padrão | 0,0127 | 0,0079 | 0,0054 |

5. DISCUSSÃO

A composição química da própolis está intimamente relacionada à biodiversidade botânica do local onde estão inseridas as colmeias, à espécie de abelha, ao clima, à temperatura e à estação do ano (SFORCIN *et al.*, 2000; BANCOVA, 2005; CASTRO *et al.*, 2007). A tipificação da própolis bruta do presente estudo contém os marcadores típicos da própolis BRG (MG), confirmando a sua origem. O predomínio de artepillin C (art C) na própolis bruta revela a presença de *Baccharis dracunculifolia* em torno da colmeia.

Tanto a própolis bruta quanto a liofilizada foram submetidas à quantificação de marcadores. A CLAE da própolis bruta identificou o art C e mais 8 de seus derivados cujas estruturas foram identificadas..

O marcador mais importante da própolis verde, o artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), que apresentava uma concentração de 13,60 mg/gr da própolis verde bruta, não foi identificado na amostra liofilizada. O procedimento de extração da WSDP não foi eficaz para a extração desse composto. 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-hidroxicinâmico.

Curiosamente o ácido cafeico observado no liofilizado não foi identificado na própolis bruta. A explicação para este resultado pode estar na amostra retirada para análise. Apenas um fragmento do lote de 7 kg da própolis bruta foi enviado para análise. Representaria melhor o perfil da própolis se essa amostra fosse retirada do extrato inicial etanólico que resultou na própolis extraída em *L*-lisina. O produto da própolis tem estreita relação com o seu método de extração, sendo o extrato etanólico de própolis o mais efetivo para a extração do artepillin C.

Uma atividade farmacológica importante para tratamento de carcinogênese é a atividade antioxidante. Diante dos compostos isolados, ou seja, ácidos fenólicos e derivados de ácidos fenólicos, já classificados como agentes antioxidante, foi então realizada avaliação da atividade antioxidante.

As amostras de extrato etanólico da própolis bruta e da própolis liofilizada mostraram valores de IC50 (concentração inibitória- quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) maiores do que as encontradas nos controles vitamina C e Trolox[®]. Entretanto a atividade antioxidante da própolis liofilizada na concentração de 1000 e 250 ppm, foi semelhante à dos controles. O

modelo para avaliação de atividade antioxidante utilizando o DHPP consiste na capacidade de o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil em solução alcoólica reduzir com antioxidante doador de Hidrogênio. O radical em meio etanólico possui comprimento de onda de 520 nanômetros e sua solução é de cor violeta. Com a redução, torna-se amarelo. O radical DPPH, ao extrair um hidrogênio do composto, vai reduzindo a sua absorção, identificando-se dessa forma sua atividade antioxidante (HEGAZI; HADY, 2002).

Os compostos identificados na própolis verde tratam-se de ácidos fenólicos ou de seus derivados. 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). O BBN, ao chegar no fígado, pode ser ativado pela 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 ions 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 em 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 glutationa peroxidase aumentando a atividade antioxidante desta. Somando-se a isso, a dose de polifenóis e flavonoides pode significar a diferença de um efeito antioxidante para um efeito 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 150 mg/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. Mas 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 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. A variação temporal de massa corporal 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 4 semanas de idade e os demais grupos iniciaram o tratamento com seis semanas de idade. Lembrando-se 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 pesos 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 a infecção urinária, litíase urinária, obstrução ureteral e ureterohidronefrose, 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.

Os exames de ultrassonografia realizados na 31^a e 40^a semanas foram importantes para a estratificação e composição dos grupos K, L, M e N, porém, devido à multiplicidade de imagens e multifocalidade das lesões em diferentes fases da carcinogênese, tornou-se o método inespecífico, embora bastante sensível. Na 40^a semana, apenas 4 animais sem imagem intravesical apresentavam lesões tumorais ao exame macroscópico, todas benignas na avaliação histopatológica. O transdutor de 10 Mhz foi bastante sensível detectando imagens de até 0,07 cm 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 bexigas 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 40 MHz, permitem-se estudos de implantes de carcinomas de células

transicionais 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 dos animais não mostrou diferenças significativas 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 41^a semana. Esse resultado estava dentro do esperado para esse modelo, mas existe relato de incidência de 100% de carcinomas na 20^a 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 3 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/adenocarcinoma. O carcinoma escamoso puro foi identificado apenas em 4 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 3 ratos com carcinoma de células transicionais em pelve renal: 2 animais pertenciam ao grupo III e 1 animal pertencia ao grupo X. Esse animal do grupo X também apresentava CCT em todo o ureter. Os 3 animais foram excluídos do estudo. Outros 3 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 e a menor incidência de carcinomas em animais do grupo I, em relação ao índice de carcinogênese e à incidência de carcinomas do grupo

controle que recebeu apenas carcinógeno, implicam dizer que a própolis extraída em *L*-lisina tem efeito quimiopreventivo na carcinogênese vesical, quando administrada crônica e previamente ao BBN (Apêndice H4). 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 alcóolico de própolis verde contendo artepillin C reduziram a carcinogênese de pulmão em camundongos, porém, nesses 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. Isso significa que 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, a incidência de tumores em ratos tratados com própolis subcutâneo (Grupo IIA) no presente estudo não foi significativa em relação ao seu respectivo controle.

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 150 mg/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 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 seqüencial, 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 50 mg/kg/peso, via oral, por 7 dias, iniciado 2 horas antes da inoculação de 2×10^6 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 seqüência 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 sobrevida 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, 3 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 sobrevivência dos animais (BENKOVIC *et al.*, 2007).

Pesquisadores brasileiros recentemente classificaram a própolis como um adjuvante não particulado. Adjuvante não particulado 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. 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. Os compostos isolados mais comuns e alguns deles sintetizados são o artemisinina, o CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), ácido p-cumárico, ácido cafeico, quercetina, 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).

A incidência de carcinomas e o índice de carcinogênese do grupo I (que recebeu própolis 30 dias antes do BBN), foram menores estatisticamente significante em relação ao índice de carcinogênese e a incidência de carcinomas do grupo III, que recebeu própolis por 40 semanas, sem a prévia administração de própolis ao carcinógeno. Ou seja, também ocorreu

uma melhor performance de proteção da própolis no grupo de animais que foram tratados com própolis previamente. Apesar disso, não houve diferença entre o grupo III e o grupo K.

As variáveis aqui analisadas, como a incidência, histopatologia, multiplicidade, invasão, atipia, diferenciação e classificação, não revelaram eficiência significativa da própolis na redução da carcinogênese quando iniciada concomitante com o carcinógeno nas duas vias administradas. 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 multiplicidade de carcinomas e maior índice de carcinogênese do que os animais que receberam apenas carcinógeno (grupo K). Somando-se a isso, 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 peritônio e metástase peritonal foi maior no grupo X.

Os tumores em animais tratados com *L*-lisina (Grupo X) também foram mais invasivos que os tumores do grupo que foram tratados com a própolis (grupo III). A proporção de tumores com grau de invasão peritonal e metástase peritonal foi maior no grupo X.

Na avaliação da densidade microvascular, observou-se que *L*-lisina estimulou a angiogênese no grupo X. E esta poderia ser uma explicação para o maior poder invasivo dos tumores vesicais em animais tratados com *L*- lisina.

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.

Quanto à incidência de carcinomas no grupo X, outro dado chama a atenção: 100% dos animais tratados com *L*-lisina desenvolveram carcinomas. Isso pode fazer da *L*-lisina um bom modelo para o estudo da carcinogênese vesical.

A maior multiplicidade de carcinomas, o maior índice de carcinogênese e invasão tumoral em animais que foram tratados com *L*-lisina e receberam BBN (grupo X) quando comparados com o grupo controle (grupo K), traduz em que existe um estímulo da *L*-lisina na

carcinogênese vesical. Lembra-se que o grupo que recebeu apenas *L*-lisina não apresentaram 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 apresentaram 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.

Carcinogênese e angiogênese estão fisiopatologicamente ligadas. Uma vez a célula tumoral tenha atingido o genótipo necessário para a progressão, a angiogênese capacita tumores a invadir e lançar metástases.

A primeira avaliação da própolis na angiogênese inflamatória foi publicada em 1999, na Turquia. No modelo de córneas de coelhos cauterizados com nitrato, a própolis da Anatólia extraída em água na concentração de 1% administrada em forma de colírio inibiu a angiogênese tanto quanto a administração de colírio de dexametasona a 0,1%. Nesta oportunidade, os autores sugeriram uma ação anti-inflamatória da própolis por inibição da ciclo-oxigenase e da lipo-oxigenase (HEPSEN; ER; ÇEKIÇ, 1999).

Em 2002, existe relato que o extrato etanólico de própolis da Coreia e CAPE sintetizado, em modelo *in vivo* de membrana corioalantoide de embrião, e modelo *in vitro* de cultura de células endoteliais, inibiram a angiogênese e diminuíram a proliferação de células endoteliais (SONG, 2002).

Em 2003, chineses estudaram efeitos do CAPE, um composto da própolis sintetizado, em cultura de células da veia umbilical humana, ensaio de pesquisa de invasão em matrigel, detecção de metaloproteinases, produção de VEGF em cultura celular de carcinomas de colon induzidos pelo N-Metiluretrano e ensaio de metástase, pela inoculação de células deste tumor em veia lateral da cauda de rato. O CAPE foi citotóxico para células tumorais, mas não para células endoteliais normais. O CAPE inibiu a invasão das células de tumor de

colon e diminuiu a expressão de metaloproteinases MMP 2 e 9, bem como de VEGF nestas células (LIAO *et al.*, 2003).

Inicialmente o estudo previa uma avaliação de angiogênese apenas em fase de progressão tumoral após a 31ª semana do experimento, porém os achados indicativos de promoção da carcinogênese pela L lisina no grupo X foram decisivos para estudo da densidade microvascular neste grupo e no grupo III (Apêndice H4).

Para avaliação da inibição de angiogênese utilizou-se parâmetro de densidade microvascular (DM), que é considerada o padrão ouro para estimativa da angiogênese (LAITAKARI; NAYHA; STENBACACK, 2009).

Na quantificação da DM, foi considerado as regiões de maior concentração de microvasos (*hot spot*), não apenas para limitar a área de avaliação, mas porque nessas regiões hipervascularizadas encontram-se clones celulares tumorais com maior potencial de angiogênese e teoricamente com maior probabilidade para metastização (VERMEULEN, *et al.*, 2002).

Alguns tumores com maior densidade vascular e com maior número de microvasos apresentam maior capacidade de metastizar, maior atividade proliferativa, menor diferenciação histopatológica e maior massa tumoral. Mas essa relação não é constante e existem variações entre os diversos tipos de tumores (mama, próstata, melanoma entre outros). A correlação desses parâmetros encontra-se em fase de investigação. Apesar das controversas, o estudo da estrutura microvascular tem orientado nos ajustes de protocolos de tratamentos e avaliação do prognóstico de alguns tumores (WEIDNER, 1999; HLATKY; HAHNFELDT; FOLKMAN, 2002; GRAÇA, *et al.*, 2004).

Para marcação dos vasos foi utilizado o anti-CD 31. O anti-CD 31 ou anti-PECAM-1 é um anticorpo que identifica imunohistoquimicamente o antígeno PECAM-1 em células endoteliais de cortes histológicos. O PECAM-1 é uma molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas. É um membro da superfamília imunoglobulina que é expressada na superfície de células endoteliais, plaquetas, monócitos, neutrófilos e células T. É o maior constituinte de junção intercelular de células endoteliais. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana (NEWMAN, 1997; NEWMAN; NEWMAN, 2009).

A análise digital da DM utilizada neste estudo é um método objetivo de quantificação microvascular e permite a diminuição da variação inter-observador encontrada na contagem manual convencional.

Na comparação da densidade microvascular entre os grupos K, L, M e N, observou-se que no grupo N a densidade microvascular foi menor que no grupo controle K,

que recebeu apenas carcinógeno, e também em relação ao grupo L, tratado com L-lisina, após a 31ª semana. Embora o grupo N tenha apresentado menor DM que o grupo L, não existe diferença significativa entre este e o grupo controle K. Se o grupo L é semelhante ao grupo K estatisticamente e ambos são diferentes do grupo N, e considerando que no grupo N a própolis foi extraída com L-lisina, então se têm duas observações: a própolis inibe a angiogênese, apesar da L-lisina usada na extração; a L-lisina parece não ter efeito sobre a DM nestes grupos de progressão (início após 32 semanas), pois não inibiu o efeito da própolis no grupo N e não potencializou o efeito do carcinógeno na DM dos tumores do grupo L.

Por outro lado, quando se comparam os grupos K, N e III, nota-se que a angiogênese foi inibida de forma significativa no grupo III e grupo N em relação ao grupo controle K. O grupo N e o grupo III receberam própolis em tempos e doses diferentes, mas, ao final de 40 semanas, a redução da DM foi semelhante. A própolis inibiu a angiogênese, independentemente de ser administrado na iniciação/promoção ou na fase de progressão tumoral (após 32 semanas).

Os resultados obtidos neste estudo contradizem a primeira publicação sobre a inibição de angiogênese pelo artemisinina C e pela própolis de Minas Gerais (AHN *et al.*, 2007). Os autores relatam que dentre os constituintes do extrato etanólico, ácido cafeico, ácido p-cumárico e artemisinina C, apenas o artemisinina C inibiu a formação de tubos em cultura 2D de células epiteliais de veia umbilical (HUVECs). Naquela oportunidade, os pesquisadores também referiram a inibição de angiogênese *in vivo* pela própolis em sarcoma 180. A própolis do atual estudo não continha artemisinina C, apenas um de seus derivados. No entanto, o ácido cafeico e o ácido p-cumárico estavam presentes.

Qual seria, então, o composto responsável pela inibição da angiogênese observada nos grupos III e N?

Em elegante e detalhado estudo utilizando o ácido cafeico e um análogo sintético, pesquisadores observaram a inibição da formação de tubos em cultura 3D de HUVECs *in vivo*, pela inibição tecidual da angiogênese em tumor renal humano implantado em camundongos *nude*. Foi ainda observada a redução de VEGF, retardo no crescimento tumoral por suprimir a fosforilação do STAT3 e a expressão de HIF-1, reduzindo a expressão de VEGF mediada pelo HIF-1 (JUNG *et al.*, 2007). Essa informação reforça a ideia de que existem outros compostos na própolis, que podem estar envolvidos com os efeitos antiangiogênicos, e não apenas o artemisinina C. Isto pode explicar, em parte, por que, mesmo não contendo artemisinina C, a própolis liofilizada (WSDP) apresentou efeitos inibitórios na

angiogênese *in vivo* no estudo aqui apresentado, uma vez que o ácido cafeico é um de seus constituintes.

O ácido p-cumárico é o composto presente em maior concentração na própolis liofilizada. Conhecendo seu potencial antioxidante é possível que este esteja envolvido no papel de quimioprevenção da própolis WSDP no grupo I.

A relação entre atividade antioxidante e inibição da angiogênese de vários componentes da própolis foi estudada *in vitro*, em HUVECs, e pelos testes de DPPH e FRAP (poder de redução antioxidante férrico). Os compostos investigados, foram quercetin, acacetin, epigenin artemillin C, CAPE, crisin, ácido p-cumárico, galactin, kampferol e pinocetin. O CAPE e o quercetin foram potentes inibidores de proliferação celular e inibidores de formação de tubos, com forte atividade antioxidante. O artemillin C, o galactin e o kampferol foram fortes inibidores de angiogênese com leve redução de atividade antioxidante. O acacetin, epigenin e pinocetin exibiram uma considerável inibição de angiogênese, porém a atividade antioxidante foi muito baixa. Dessa forma, a relação da inibição da angiogênese com a atividade antioxidante foi positiva no artemillin C, CAPE, galagin, kampferol e quercetin (AHN *et al.*, 2008).

Foi proposto um mecanismo de ação para inibição da formação de tubos e apoptose de células endoteliais em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), utilizando própolis brasileiras de Minas Gerais, em HUVEs. Foram investigados os dois maiores sinalizadores de sobrevivência celular, o ERK 1/2 (*extracelular signal-regulated kinase 1/2*) e o Akt. Utilizando-se uma substância padrão, o V0126 (um conhecido inibidor específico de proteína cinase ERK1/2), com detecção por *western blotting* em seus caldos de cultura, revelou-se que o extrato de própolis suprime a fosforilação do ERK1/2. Foi demonstrado que tanto a própolis como o V0126, de forma similar, induziram a ativação de caspase-3 e clivagem de DNA polirribose polimerase (PARP) e laminina A/C (todos marcadores moleculares de apoptose). O ERK1/2 é essencial para a angiogênese *in vitro e in vivo*. O extrato de própolis suprimiu a ativação da ERK1/2, sem efeito para Akt. Porém, a inativação do ERK1/2 é suficiente para induzir a apoptose de célula endotelial. Fatores pró-angiogênicos, como o bFGF e PMA (*Esther phorbol-12 myristate-13 acetate-ativador exógeno de proteína cinase*), estimulam a sinalização do ERK 1/2, o sinalizador de sobrevivência da célula, facilitando a angiogênese. A própolis inibe a ativação de ERK 1/2, ativando a via caspase, induzindo a apoptose e suprimindo assim a angiogênese (KUNIMASA *et al.*, 2009).

Recente opinião publicada após revisão da escassa literatura existente sobre a inibição de angiogênese pela própolis sugeriu um possível mecanismo de ação da inibição da

angiogênese em córneas de coelhos, pela inibição de metaloproteinases e do VEGF (KESSHAVARZ *et al.*, 2009).

O que se tem descrito até o momento é que tanto o artepillin C, quanto o ácido cafeico e o CAPE (ácido cafêico éster - fenetil), compostos identificados na própolis de diferentes regiões do mundo, são capazes de, em determinada dose, inibir angiogênese *in vitro* em culturas de HUVECs e *in vivo* em alguns carcinomas (SONG, *et al.*, 2002; LIAO *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2007; AHN *et al.*, 2008). Uma vez que a própolis liofilizada possui o ácido cafeico, pode ser que esse composto tenha colaborado em parte com a inibição de angiogênese nos grupos III e N.

O celecoxibe administrado no grupo M, na dose de 30 mg/kg/peso, não foi efetivo para inibir a angiogênese de forma significativa. Os trabalhos mostram que as doses de 10 mg/kg/peso, 25 mg/kg/peso e 30 mg/kg/peso inibiram a angiogênese em tumores humanos de pulmão, estômago e colon, respectivamente, inoculados em subcutâneo de camundongos *nude*, e que 30 mg/kg/peso reduziram a angiogênese em gliosarcoma de ratos inoculados em cérebro de ratos Spragey Dowley (LEALTY *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004; KLENKE *et al.*, 2006).

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 superexpressada 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 bexigas em ratos (GRUBBS *et al.*, 2000; MAZHAR; GILMORE; WAXMAN, 2005; KLEIN *et al.*, 2005).

Não foram observadas diferenças na progressão tumoral entre os grupos K, L, M e N nas variáveis avaliadas. Entretanto, quando comparado o grupo N com o grupo controle K, foram constatados tumores mais invasivos no grupo N.

Comparação realizada entre os grupos K, X e III revelou um novo fenômeno. A densidade microvascular em tumores de animais que foram tratados com L-lisina desde o início do BBN (grupo X) foi significativamente maior em relação ao controle K e em relação

ao grupo que foi tratado com própolis (WSDP) desde o início do carcinógeno (grupo III). Esses dados sugerem que a *L*-lisina, quando iniciada junto com o carcinógeno, possui efeito angiogênico. O efeito angiogênico obtido pela *L*-lisina no grupo X é confirmado quando se comparam os grupos K, X e L. No entanto, em dose dupla, após a 31ª semana no grupo L, a *L*-lisina não produziu efeitos significantes na DM dos carcinomas em relação ao controle K.

Apesar de a dose de *L*-lisina no grupo L ser duas vezes maior que a dose no grupo X, as razões pelas quais não se observou estímulo de angiogênese é intrigante. Isso ocorreu por ser uma dose diferente ou os efeitos angiogênicos observados no grupo X seriam a expressão gênica de um tumor mais agressivo, portanto de crescimento mais rápido, mais invasivo, efeitos estes produzidos pela *L*-lisina durante a iniciação/promoção da carcinogênese do epitélio vesical? Parte desta resposta pode estar no efeito promotor da carcinogênese, observado neste estudo.

Outra observação importante é que, embora os resultados apontem para um efeito angiogênico significativo da *L*-lisina, no Grupo X, esse efeito não foi capaz de superar os efeitos inibitórios da angiogênese da própolis (WSDP) no grupo III, sabendo que a quantidade de *L*-lisina contida na própolis foi semelhante (150 mg/kg).

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 dieta padrão fornecida aos animais possui a quantidade de *L*-lisina preconizada internacionalmente em rações de animais (Anexo C).

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 Herpes vírus. Ela parece ter uma relação antagônica com o aminoácido arginina (necessário para a replicação do Herpes vírus). 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 produzindo vasodilatação (PAULING, 1991; MCBEATH; PAULING, 1993; PAULING, 1993; *L*-LYSINE... 2007).

Recentes publicações demonstraram *in vitro e in vivo* que uma nutriente mistura (NM) rica em *L*-lisina, ácido ascórbico, prolina e chá verde suprime o crescimento de vários tumores humanos (mama, próstata, bexiga, testículo, osteosarcoma e fibrossarcoma) inoculados em camundongos *nude ou* em cultura de células. A imunohistoquímica revelou a diminuição de expressão do fator de crescimento VEGF, angiopoetina, PDGF e TGF beta (fatores fundamentais para desenvolvimento da angiogênese). A NM também reduziu as MMPs 2 e 9 (metaloproteinases 2 e 9) e inibiu a invasão das células *in vitro*. Em modelos de carcinogênese de mama pelo N-metil-N-nitrosourea em ratos, a NM reduziu a incidência e multiplicidade de tumores. Os autores defendem a mistura NM por reunir nesta efeitos essenciais para o tratamento de câncer. A inibição de expressão de metaloproteinases e fatores de crescimento obtida em seus experimentos podem combinar com efeitos esperados nos nutrientes: o chá verde, por ser um potente agente anticâncer, com efeitos inibitórios no crescimento de neoplasias, na angiogênese e metástases; o ácido ascórbico, pela ação inibitória do crescimento neoplásico, da divisão celular e da produção de radicais livres e que, através da hidroxilação de resíduos de lisina e prolina, regula a síntese de colágeno ao nível transcricional (pacientes com câncer têm níveis baixos de vitamina C). Dessa forma, a invasão da matriz pode ser controlada inibindo as metaloproteinases e fatores de crescimento, fortalecendo e estabilizando o colágeno com aumento do tecido conjuntivo, contribuindo assim para um “encapsulamento” do tumor (ROOMI, *et al.*, 2004a; ROOMI *et al.*, 2004b; ROOMI *et al.*, 2005a; ROOMI *et al.*, 2005b; ROOMI, IVANOV *et al.*, 2005c; ROOMI *et al.*, 2005d; ROOMI *et al.*, 2005e; ROOMI *et al.*, 2005f; ROOMI *et al.*, 2006). Esses relatos fazem pensar no quanto a *L*-lisina pode estar contribuindo para melhorar o colágeno do hospedeiro, quando comparados com os resultados obtidos nos experimentos da presente tese. O quanto, como e quando o colágeno do hospedeiro poderia responder aos nutrientes apresentados, teoricamente, uma vez que estudos têm demonstrado que as células em torno do microambiente tumoral podem apresentar danos epigenéticos oriundos de proteínas expressadas pelas células tumorais, modificando a expressão de células normais do

microambiente onde o tumor está hospedado, possibilitando o crescimento e invasão tumoral (HU; POLYAK, 2008). Uma teoria da evolução tumoral? Não se pode deixar de filosofar sobre o assunto.

Na revisão sobre WSDP, não foram encontradas referências que apresentassem grupo controle com a *L*-lisina. Além disso, este é o primeiro relato a mostrar efeitos da *L*-lisina na promoção da carcinogênese e estímulo da angiogênese de bexiga induzida pelo BBN.

Ensaio 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 (Apêndice – I e Apêndice J) e os resultados mostraram que tanto a própolis quanto a *L*-lisina nas doses de 150 mg/kg peso, por 40 semanas, não são genotóxicas para a medula óssea nem para linfócitos de sangue periférico. 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 (Apêndice – I e Apêndice J). Estes testes normalmente são utilizados para avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos.

O princípio do Teste do Cometa está baseado na capacidade de o DNA migrar em uma matriz de agarose durante uma eletroforese. O Teste do Cometa serve para detectar alterações genômicas e não para detectar mutações. A análise é visual dentre cinco categorias que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando grau de lesão sofrido pela célula (Apêndice I). O Teste do Micronúcleo é utilizado para detectar danos cromossômicos em fuso mitótico e quebras cromossômicas, e baseia-se em que, durante o processo de maturação do eritroblasto, o núcleo é expulso da célula e na ausência de danos por quebra ou danos no fuso mitótico, nenhuma cromátide residual (micronúcleo) fica no interior da célula. Micronúcleos são estruturas cromátides delimitadas por membranas separadas do núcleo principal e visível em células na interfase. Se houver a presença de micronúcleo, significa que ocorreu dano no cromossoma ou no fuso mitótico, com perda de cromátide (CAVALCANTI, 2006).

Dois outros ensaios foram desenvolvidos paralelamente para avaliação de efeitos antitumorais da própolis, por 7 dias, em ratos inoculados com 2×10^6 células de tumor de Walker em axila esquerda e camundongos inoculados com 2×10^6 células de sarcoma 180 em axila esquerda, com doses diferentes. Não ocorreram reduções dos tumores pela própolis nem

ocorreram diferenças significantes nos pesos de fígado, baço e corpo em relação ao controles, (Apêndice K).

Foi realizado um último ensaio para avaliação do efeito da própolis por 7 dias na angiogênese peritumoral em ratos inoculados com 10^6 de células de tumor de Walker, em subcutâneo no dorso do animal. A quantificação da angiogênese foi realizada no escalpe do dorso pelo SQAN (Sistema de Quantificação de Angiogênese), um programa de computador desenvolvido para este fim (FECHINE-JAMACARU, 2006). Não ocorreu inibição da angiogênese (Apêndice L).

Considerações finais

Esta tese desenvolveu-se em 3 fases distintas.

A primeira fase concentrou-se em obter um produto de própolis padronizado (mesma origem, mesmo lote), solúvel em água (WSDP), bem como na criação de condições para mantê-lo livre de impurezas, contaminações e sem perdas ou acréscimos de umidade por 40 semanas. Objetivando ainda a padronização, o produto da própolis foi tipificado e quantificado. Ensaio antioxidante *in vitro* revelou boa atividade antioxidante, próximas dos controles vitamina C e Trolóx[®].

A segunda fase da pesquisa constituiu-se em desenvolver o modelo experimental *in vivo* da carcinogênese de bexiga, classicamente descrito, utilizando-se o BBN por 14 semanas em água de beber. Os animais foram submetidos a exames de ultrassonografia em dois momentos críticos: na 31ª e 40ª semanas após início do carcinógeno. Esse método de imagem, embora inespecífico, mostrou-se bastante sensível podendo ser utilizado futuramente em avaliações de implantes ortotópicos intravesicais.

A terceira fase do experimento destinou-se ao estudo histopatológico da carcinogênese e angiogênese. A carcinogênese foi estudada pelos métodos de: mapeamento de lesões, cortes histopatológicos corados pela hematoxilina e eosina, classificação quanto ao índice de carcinogênese, incidência e multiplicidade de carcinomas, invasão, atipias, diferenciação e tipo histológico. A angiogênese foi avaliada pelo método de quantificação da densidade microvascular em carcinomas, em cortes histológicos corados através de imunomarcção (CD-31), utilizando um programa de computador especialmente para este fim.

Os resultados obtidos claramente demonstraram que o produto da própolis verde extraída em *L*-lisina inibe a angiogênese nas doses e tempos estabelecidos pelo desenho

experimental, bem como inibe a carcinogênese quando administrado previamente ao carcinógeno. Também ficou demonstrada estatisticamente a ação da *L*-lisina como promotora da carcinogênese de bexiga (dado este não encontrado na literatura), expressos no índice de carcinogênese, na multiplicidade e invasão de carcinomas, bem como no estímulo da angiogênese nestes tumores. A incidência de 100% de carcinomas em animais tratados com *L*-lisina (após iniciação), pode torná-la um modelo para estudo da carcinogênese de bexiga em ratos.

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 IOIRISH, 1981)

6 CONCLUSÃO

O produto da própolis verde extraída em *L*-lisina exerce efeito de quimioprevenção por inibir a carcinogênese de bexiga quando administrada previamente ao carcinógeno e inibe a angiogênese em tumores de bexiga induzidos pelo BBN.

7 REFERÊNCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, n. 5, 945-946, 1994.

AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAKI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor -induced angiogenesis by brazilian propolis: major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. **Can. Let.**, v. 252, p. 235-243, 2007.

AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; OHTA, T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Mol. Nutr. Food Res.** Epub ahead of print, DOI 10.1002/mnfr.200800021, 2008.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUSMAN, J. P.; PARK, Y. K. 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.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L., CASTRO, I. S. R.; CABRAL, C.M.; COSTA-NETO, J.A.; CURY, P. L. 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.

ALGIRE, G. H.; CHARLKLEY, H. W.; LEGALAIS, F. Y.; PARK, H. D. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and normal and neoplastic transplants. **J. Natl. Cancer Inst.**, p. 73- 85, 1945.

ALLINEN, M.; BEROUKHIM, R.; CAI, L.; BRENNAN, C.; LAHTI-DOMENICI, J. HUANG, H.; PORTER, D.; HU, M.; CHIN, L.; RICHARDSON, A.; SCHNITT, S. SELLERS, W. R.; POLYAK, K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell.**, v. 6, p. 17-32, 2004.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240. 1992.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620 p.

AUSPRUNK, D. H.; FOLKMAN J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Res.**, v. 14, p. 53 – 65, 1977.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of brazilian red propolis and their preferential 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 standartization. **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.

BARROS, M. P.; SOUZA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Effect of brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J. Eth. Pharm.**, v. 110, p. 567-571, 2007.

BANSKOTA, A. H.; TEZUCA, Y.; ADNYANA I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. 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.; TEZUCA, Y.; ADNYANA I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from brazilian propolis. **Phytomedicine** v. 8, n. 1, p. 16- 23, 2001.

BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L. Y.; TEZUCA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J. Eth. Pharm.**, v. 80, p. 67-73, 2002.

BENKOVIC, V.; KNEZEVIC, A. H.; BRONZOVIC, G.; KNEZEVIC, F.; DIKIC, D.; BEVANDA, M.; BASIC, I.; ORSOLIC, N. 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.; ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A. H.; RAMIC, S.; DIKIC, D.; BASIC, I.; KOPJAR, N. 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.**, vol 8, p. 587-594, 1972.

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

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETZ, G.; CZUBA, Z. P.; SCHELLER, S.; KROL, W. 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.; WENZEL, M.; CAO, Y.; TROJAN, L.; HÄCKER, A.; ARANCIBIA, M. F.; ALKEN, P.; MICHEL, M.S. 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.; IZZO, A. A.; CARLO, G. D.; CARLO, G. D.; MAFIA, P.; RUSSO, A.; MAIELLO, F. M.; CAPASSO, F.; MASCOLO, N. 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, s. 1 p. S38- S 43, 2002.

BRYAN, G. T. ; COHEN, S. M. **The pathology of bladder cancer**. Boca Raton: CRC Pres Inc, v.II, 1984, 283 p.

BROWDER, T.; FOLKMAN, J.; PIRIE-SHEPHERD, S. The hemostatic system as a regulador of angiogenesis. **J. Biologic. Chemes**, v. 275, n. 3, p. 1521- 1524, 2000.

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.**, Doi: 10.1093/ecan/nem147, 2007.

CALÓ, V.; MIGLIAVACCA, M.; BAZAN, V.; MACALUSO, M.; BUSCEMI, M.; GEBBIA, N.; RUSSO, A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. **J. Cell. Physiol.** v. 197, p. 157-168, 2003.

CARDILE, V.; PANICO, A.; GENTILE, B.; BORRELI, F.; RUSSO, A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. **Life Sci.**, v. 73, p. 1027-1035, 2003.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.;ALENCAR, S. M. IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quim. Nova**, v.30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

CASTEGNARO, M.; EISENBRAND, G.; ELLEN, G.; KEEFER, L.; KLEIN, D.; SANSONE, E. B.; SPINCER, D.; TELLING, G.; WEBB, K. Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory waste: some N- nitrosamines. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, n.43, p. 23 – 26, 1982.

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico, um diterpeno isolado da planta *copaifera langsdorffii* desf. (leguminosae)** Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CHIN, J.; KADHIM. S.; GARCIA, B.; KIM, Y. S.; KARLIK, S. 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.; ARAI, M.; JACOBS, J. B.; FRIEDEL, G. H. Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary 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

COOKE, R. **A Guerra contra o câncer. A revolucionária descoberta da angiogênese e as novas perspectivas para a cura do câncer.** Trad. Maria Tereza Machado. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. 415 p.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanism of blood vessel growth. **Cardiovascular res.** v. 49, p. 507 – 521, 2001.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; CASTRO, S. L. 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.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. A.; PARK, Y. K. 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: 04 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.; IVANOVSKA, N.; MANOLOVA, N.; BANCOVA, V.; NIKOLOV, N.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, p. 155-162, 1991.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S.; 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.

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

DVORAK, A. M.; KOLN, S.; MORGAN, E. S.; FOX, P.; NAGY, J. A.; DVORAK H. F. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. **J. leuc. Biol.**, v. 59, p.100 – 114, 1996.

EICHHORN, M. E.; KLEESPIES, A.; ANGELE, M. K.; JAUCH, K. W; BRUNS, C. J. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 392, p. 371-379, 2007.

EL-KATIB, A. S.; AGHA, A. M.; MAHRAN, L. G.; KHAYYAL, M. T. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. **Z. Naturforsch**, v. 57c, p. 379-385, 2002.

EPSTEIN, J I.; AMIN, M B.; REUTER, V. R.; MOSTOFI, FATHOLLAH K.; The bladder consensus conference committee **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, p. 1435- 1448, 1998.

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 Cotran. Trad. Maria da Conceição Zacharias. Robbins and Cotran, Pathologic bases of disease 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1067- 1079 , 2005.

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.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **In vivo quantification of corneal angiogenesis using digital image processing**. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

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

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 280, p. c1358- c1366, 2001.

FISCHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.** v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. A.; HUBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. 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.

FOLBERG, R.; MANIOTIS, A. J. Vasculogenic mimicry. **APMIS**, v. 112, p. 508 - 525, 2004.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 273-286, 2007.

FOLKMAN, J.; KALLURI, R. Cancer without disease. **Nature**, v. 427, p. 787, 2004.

FRAGA, 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.

FU, S. L.; WU, Y. L.; ZHANG, Y. P.; QIAO, M. M.; CHEN, Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v.10, n.13, p.:1971-1974, 2004.

FUKUSHIMA, S.; HIROSE, M.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; HIRAO, K. 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. Modification of tumor development in the urinary bladder. **Prog. Exp. Tumor. Res.**, v.33, p. 154-174, 1991.

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.; HEPBURN, H. R.; XUAN, H.; CHEN, M.; DAYA, S.; RANDLOFF, S. E. 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 *Baccharis dracunculifolia* 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.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; FANELLI, M.; TEICHER, B. A. Combination of Antiangiogenic Therapy With Other Anticancer Therapies: Results, Challenges, and Open Questions **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 1295-1311, 2005

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K. 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.; BIRMAN, T.; DINABURG, A.; AYESH, S.; OHANA, P.; HOCHBERG, G. A. Chemically induced bladder cancer: A sonographic and morphologic description. **Urology**, v. 68, n. 1, p. 231-235, 2006.

GOLIJANIN, D. J.; KAKIASHVILI, D.; MADEB, R. R.; MESSING, E. M.; LERNER, S. P. 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.

GRAÇA, B.; LUNET, C.; COELHO, A. S.; MONTEIRO, G.; FREIRE, P.; SPEIDEL A.; CARVALHO, L. Angiogenesis and cancer: from biopathology to therapy **Acta Med. Port.**, v. 217, n. 1, p. 76-93, 2004.

GRUBBS, C. J.; LUBET, R. A.; KOKI, A. T.; LEAHY, K. M.; MASFERRER, J. L.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J.; HILL, D. L.; SEIBERT, K. 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.; MURAI, T.; YOSHINO, H.; GOSSHIMA, H.; MORF, S.; TAKASHIMA, A.; SHIRAI, T.; FUCUSHIMA, S. Hepatocarcinogenic activity of n-butyl-n(4-hidroxybutyl)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.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. 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.; ÇEKIÇ, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic Res.**, v. 31, p. 426-431, 1999.

HERNANDES, J.; GOYOCOOLEA, F. M.; QINTERO, J.; ACOSTA, A.; CASTAÑEDA, M.; DOMINGUEZ, Z.; ROBLES, R.; MORENO, L. V.; VELAZQUEZ, E. F.; ASTIAZARAN, H.; LUGO, E.; VELAZQUEZ, C. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. **Planta Med.**, v. 73, p. 1469- 1474, 2007.

HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; HANANOUCI, M.; SHIRAI, T.; OGISO, T.; TAKAHASSHI, M.; ITO, N. Different susceptibilities of the urinary bladder epithelium of animal species to three nitroso compounds. **Gann**, v. 67, p. 175- 189, 1976.

HIROSE, M.; TAKESADA, Y.; TANAKA, H.; TAMANO, S.; KATO, T.; SHIRAI, T. 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 médium-term multi-organ carcinogenesis model. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 207- 212, 1997.

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 94, n. 12, p. 883-893, 2002.

HSIAO, G.; LEE, J. J.; LIN, K. H.; SHEN, C. H.; FONG, T. H.; CHOU, D. S.; SHEU, J. R. 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.; PATRICIA, W. M.; XIE, J. G.; HAN, J.; FRENKEL, K.; GRUMBERGER, D.; CONNEY, A. H. 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, sup, p. 923-927, 2002.

IARC – Handling chemical carcinogens in the laboratory problems of safety. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, v. 33, p. 1-33, 1979.

IARC - Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory waste: some N- nitrosamines. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, n.43, p. 1 – 73, 1982.

IARC – International Classification of rodent tumours. Part I: The rat. 3- urinary system. **IARC Sci. Publ.**, v. 122, p. 1- 46, 1992.

IIDA, K.; ITOH, K.; KUMAGAI, Y.; OYASU, R.; HATTORI, K.; KAWAI, K.; SHIMAZUI, T.; AKAZA, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.64, p. 6424 -6431, 2004.

IIDA, K.; ITOH, K.; MAHER, J.; KUMAGAI, Y.; OYASU, R.; MORI, Y.; SHIMAZUI, T.; AKAZA, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 2398-2403, 2007.

INOKUCHI, Y.; SHIMAZAWA, M.; NAKAJIMA, Y.; SUEMORI, S.; MISHIMA, S.; HARA, H. Brazilian green propolis protect against retinal damage in vitro and in vivo. **eCAM**, v. 3, n. 1, p. 71 – 77, 2006.

IVANOVSKA, N. D.; DIMOV, V. D.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **J. Eth. Pharm.**, v. 47, p. 135-143, 1995.

ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; SAMPIETRO, A. R.; VANTTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **J. Eth. Pharm.**, v. 76, p. 165- 170. 2001.

IOIRISH, N. **As Abelhas, farmacêuticas com asas**. trad. Marques, A. J. ,Gurulhos: Editora Parma, 1981, 228p.

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.; HIASA, Y.; TAMAI, A.; OKAGIMA, E.; KITAMURA, H.; Histogenesis of urinary bladder tumor induced by N-butyl-N-(4-hidroxybutyl) nitrosamine in rats. **Gann**, v. 60, p. 402-410, 1969.

ITO, N.; MATAYOSHI, K.; AKAI, M.; YOSHIOKA, Y.; KAMAMOTO, Y.; MAKIURA, S.; SUGIHARA, S. 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.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat. Med.**, v.9, p. 685-693, 2003.

JASPRICA, I.; MORNAR, A.; DEBELJAK, Z.; BUBALO, A. S.; SARIC, M.M; MAYER, L.; SOBOCANEC, S.; SVERCO, V. 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.; SHIH, M. K.; KAO, C. M.; LIU, T. Z.; LIU, T. Z.; CHEN, S. C. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 893-897, 2000.

JONES, T. D.; WANG, M.; EBLE, J. N.; MACLENNAN, G. T.; LOPEZ-BELTRAN, A.; ZHANG, S.; COCCO, A.; CHENG, L. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. **Clin. Cancer. Res.**, v. 11, p. 6512–6519, 2005.

JUNG, J. E.; KIM, H. S.; LEE, C. S.; PARK, D. H; KIM, Y.AN.; LEE, M. J.; LEE, J. W.; PARK, J. W.; KIM, M. S., YE, S. K.; CHUNG, M. H. 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.; CHIN, J. L.; BATISLAM, E.; KARLIK, S. J.; GARCIA, B.; SKAMENE, E. 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.; KOMATSU, H.; HONAMA, Y.; NUJIMA, 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.

KAWANISHI, H.; TAKAHASHI, T.; ITO, M.; MATSUI, Y.; WATANABE, J.; ITO, N.; KAMOTO, T.; KADOWAKI, T.; TSUJIMOTO, G.; IMOTO, I.; INAZAWA, J.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O. Genetic analysis of multifocal superficial urothelial cancers by array-based comparative genomic hybridisation. **British J. Cancer**, v. 97, n. 2, p. 260-266, 2007.

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.

KESSHAVARZ, M.; MOSTAFAIE, A.; MANSOURI, K.; SHAKIBA, Y.; REZA, H.; MOTLAGH, M. Inhibition of corneal neovascularization with propolis extract. **Arc. Med. Res.**, v. 40, p. 59 - 61, 2009.

KIMOTO, T.; MIYATA, S. K.; HINO, K.; MICALLEF, M. J.; ANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by brazilian propolis and artemillin C. **Virchows Arch.**, v. 438, p. 259-270, 2001.

KLEIN, R. D.; PELT, C. S. V.; SABICHI, A. L.; CERDA, J. D.; FISCHER, S. M.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K. 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.

KLENKE, F. M.; GEBHARD, M. M.; EWERBECK, V.; ABDOLLAHI, A.; HUBER, P. E.; SCKELL, A. The selective COX-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: An intravital microscopy study in mice. **BMC Cancer**, v. 6, n. 9, p. 1-8, 2006.

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

KONISH, S. ; CHRISTINE, A.; SAWAYA, H. F.; Analise 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: 04 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: 04 jan. 2008.

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

KUNIMASA, K.; AHN, M. R.; KOBAYASHI, T.; EGUCHI, R.; KUMAZAWA, S.; FUJIMORI, Y.; NAKANO, T.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK ½. **eCAM**. Doi: 10.1093/ecam/nep024. 2009.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Eth. Farm.**, v. 64, p. 235-240, 1999.

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

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, 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.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; CHANDE, C. G.; NEVES, I. R. Efeito antimicrobiano in vitro de própolis. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v. 48, n. 2, p. 227- 229, 1996.

LAITAKARI, J.; NÄYHÄ, V.; STENBÄCK, F.; Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, n.4, p. 394-401, 2004.

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

LEAHY, K. M.; ORNBERG, R. L.; WANG, Y.; ZWEIFEL, B. S.; KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxibe reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. **Cancer Res.**, v. 62, p. 625 – 631, 2002.

LEE, Y. J.; KUO, H. C.; CHU, S.Y.; WANG, C. J.; LIN, W. C.; TSENG, T. H. 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. Pitsburg, 2008.

LIAO, H. F.; CHEN, Y. Y.; LIU, J. J.; HSU, M. L.; SHIEH, H. J.; LIAO, H. J.; SHIEH, C. J.; SHIAO, M. S.; CHEN, Y. J. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on

angiogenesis, tumor invasion and metastasis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7907-7912, 2003.

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

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

LONGO, R.; SARMIENTO, R.; FANELLI, M.; CPACCETTI, B.; CATTUSO, D.; GASPARINI, G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. **Angiogenesis**, v. 5, p. 237 – 256, 2002.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of brazilien 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**, v. 19, n. 5, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES F.; VIGUERA, C. G.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Eth Pharmac.**, v. 74, p. 105- 112, 2001.

MARCUCCI, M. C. 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.

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

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.

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

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, Y.; OHTA, S.; YOSHIDA, C.; ARAKI, Y.; AKAO, Y. SUZUKI, K.M.; Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **J. Eth. Pharm.**, v. 99, p. 5-11, 2005.

MISHIMA, S.; YOSHIDA, C.; AKINO, S. A.; SAKAMOTO, T. 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.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S.; MAEMURA, S.; KUDO, H.; SUZUKI, S.; KUWA, K.; YOSHIMURA, S.; SASSA, S.; NAKAYAMA, T.; Effect of a new clerodane dipentenoid isolated from propolis on chemical induced skin tumors in mice. **Anticancer. Res.**, v. 16, p. 2669-2672. 1996.

MO, L.; ZHENG, X. Y.; HUANG, H. Y.; SHAPIRO, E.; LEPOR, H.; CORDON-CARDO, C.; SUN, T. T.; WU, X. R. Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 2, p. 314-325, 2007.

MORENO, M. I. N.; ISLÁ, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **J. Eth. Pharm.**, v. 71, p. 109-114. 2000.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAH, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chem.**, v. 103, p. 1097-1103, 2007.

MOTULSKY, H. **Intuitive biostatistics**. Oxford: Oxford University Press, 1995. 386 p.

MOULTON, K. S.; VAKILI, K.; ZURAKOWSKI, D.; SOLIMAN, M.; BUTTERFIELD, C.; SYLVIN, E.; LO, K. M.; GILLIES, S.; JAVAHERIAN, K.; FOLKMAN, J. Inhibition of

plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 8, p. 4736- 4741, 2003

MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A.; M. V. C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M.; Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Eth. Pharm.**, v. 79, p. 331-334, 2002.

Nacional Cancer Intitute. 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 mai, 2009.

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

NAGY, J. A.; BENJAMIM, L.; ZENG, H.; DVORAK, A. M.; DVORAK H. F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**, v 11, n. 2, p. 109 - 119, 2008.

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of própolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Scie.**, v.80, p. 370- 377, 2007.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chem.**, v. 80, p. 29- 93, 2003.

NAGAOKA, T.; BANKOSTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K. MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. 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.

NAM, D. H.; PARK, K.; PARK, C.; IM, Y. H., KIM, M. H.; LEE, S.; HONG, S. C.; SHIN, H. J.; KIM, J. H.; EOH, W.; MCDONNELL, T. J.; Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. **Oncol Rep.**, v.11, n. 2, p. 263-268, 2004.

NEWMAN, P. J. The biology of PECAM-1. **J Clin Invest.**, v.100, p. S25-S29, 1997.

NEWMAN, P. J.; NEWMAN, D. K.; Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 6, p. 953-964, 2003.

NICOLOV, N.; MAREKOV, N.; BANCOVA, V.; POPOV S.; IGNATOVA, R.; VALDIMIROVA I. **Method for the preparation of water-soluble derivative of propolis.** Patente n. 79903. Sofia. Bulgaria. 1987

NISHIO, Y.; KAKIZOE, T.; OHTANI, S. S.; SUGIMURA, T.; FUKUSHIMA, S. *L*-isoleucine e *L*-leucine: tumor promoter of bladder cancer in rats. **Science**, v. 231, p. 843-845., 1986.

OGETURK, M.; KUS, I.; COLAKOGLU, N.; ZARARSIZ, I.; ILHN, N.; SARSILMAZ, M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. **J. Eth. Pharm.**, v. 97, p.273-280, 2005.

OHTANI, M.; KAKZOE, T.; NISHIO, Y.; SATO, S.; SUGIMURA, T.; FUKUSHIMA, S. 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.

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

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.; OZCELIK, N.; YLMAZ, H. R.; UZ, E. 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 equilinum* sobre a carcinogênese induzida por N-butyl-N-(4-hidroxibutil)nitrosamine e uracil na bexiga urinária de rato. Dissertação (mestrado em patologia) Faculdade de medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista. Botucatu –São Paulo, 1993.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; DE LA CRUZ P, L.F.; LOPES, C. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. **Exp. Oncol.** v. 28, p. 2-11, 2006.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. J.; PINTO, A. S.; MESSAGE, D.; TINOCO, A. L. A.; MAGALHÃES, N. M.; SILVA, J. F.; HUERTAS, A. A. G.; PINTO, J. G.; PEZERICO, G. B.; TIZIOMIS, A. C. Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzida em coelhos. **Medicina**, v. 35, p. 464- 469, 2002.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN J. M.; BANKOVA, V. 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 propolis: a factor of antitumor reactivity. **J. Eth. Pharm.**, v.84, p. 265-273, 2003.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A. H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. 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.; TERZIC, S.; MIHALJEVIC, Z.; SVER, L.; BASIC, I. 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.; 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.; BENKOVIC, V.; KNESEVIC, A. H.; KOPJAR, N.; KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; MIHAJELVIC, Z.; BENDELJA, K. ; BASIC, I. 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.; 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. 113-21, 2009

OYASU, R.; SAMMA, S.; OZONO, S.; BAUER K.; WALLEMARK C.; HOMMA, Y. Induction of high-grade, high-stage carcinomas in the rat urinary bladder. **Cancer**, v.59, p. 451- 458, 1987.

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

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

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, 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 mai. 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; WANG, H. K.; BASTOW, K.; CONSENTINO, M.; LEE, K. H. 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 mai. 2008.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUGIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52 p. 1100-1103, 2004.

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.; SCREMIN, F. M.; RAICHASKI, L. B.; MARCUCCI, M. C.; SCREMIM, A.; CALIXTO, J. B. 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.; DANTAS, A. P.; BANKOVA, V.; LOGHI, D. T.; SCREMIM, A.; CASTRO, S. L.; CALIXTO, J. B. 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. ; TEIXEIRA, C.; MARTINS, R.; SCREMIN A.; DIRSCH V. M.; VOLLMAR, A. M.; ABREU, S. R. L.; Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a brazilian green 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**, v. 25, n. 2, 2002.

PETTERSSON, A.; NAGY, J. A.; BROWN, L. F.; SUNDBERG, C.; MORGAN, E.; JUNGLES, S.; CARTER, R.; KRIEGER, J. E.; MANSEAU, E.J.; HARVEY, V. S.; ECKELHOEFER, I. A.; FENG, D.; DVORAK, A. M. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 1, p. 99- 115, 2000.

PETTY, A. P.; GARMAN, K. L.; WINN, V. D.; SPIDEL, C. M.; LINDSEY, J. S. Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation. **Am J Pathol.**, v. 170, n. 5, p.1454-1456, 2007.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. 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.; BUB, A.; SCHRÖDER, N.; RECHKEMMER, G.; 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.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; NETO, F. R. A. Flavonoids and trypanocidal activity of bulgarian propolis. **J. Eth. Pharm.**, v.88, p. 189-193, 2003.

RAO, C. H.; DESAI, D.; SIMI, B.; KULKARNI, N.; AMIM, S.; REDDY, B. S.; 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.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIM, S. RENDDY, B. S. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2310- 2315, 1995.

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.

ROBERTSON, G. P. Mig-7 Linked to Vasculogenic Mimicry. **Am J Pathol.**, v. 170, n.5, p. 1454- 1456, 2007.

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

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Synergistic antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, and epigallocatechin gallate on human fibrosarcoma cells ht-1080. **Ann. Cancer Res. Ther.**, v.12, n. ½, p. 146-156, 2004a.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and epigallocatechin gallate on prostate cancer cell lines PC-3, LNCaP, and DU145. **Res Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 115-116, p. 251- 264, 2004b.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Antitumor effect of nutrient synergy on human osteosarcoma cells U-2OS, MNNG-HOS and Ewing's sarcoma SK-ES.1. **Oncol. Rep.**, v.13, n. 2, p.253-257, 2005a

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vivo antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human prostate cancer PC-3 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry. **In Vivo.**, v. 19, n. 1, p. 179-183, 2005b.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vitro and in vivo antitumor activity of a mixture of lysine, proline, ascorbic acid, and green tea extract on human breast cancer lines MDA-MB-231 and MCF-7. **Med Oncol.**, v. 22, n. 2, p.129-138, 2005c.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vivo antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human colon cancer cell HCT 116 xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry. **Oncol. Rep.**, v. 3, n. 3, p. 421- 425, 2005d.

ROOMI, M. W.; ROOMI, N.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Inhibitory effect of a mixture containing ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on critical parameters in angiogenesis. **Oncol. Rep.**, v. 14, n. 4, p. 807-815, 2005e.

ROOMI, M. W.; ROOMI, N.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Modulation of *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats by combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract **Breast Cancer Res.**, v.7, n. 3, R291-R295, 2005f.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. Antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and green tea extract on bladder cancer cell line T-24. **Int. J. Urol.**, v. 13, p. 415- 419, 2006.

SAWAYA A. C. H. F.; SOUZA, K.S.; MARCUCCI, M. C.; CUNHA, I. B. S.; SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of brazilian propolis extract by chromatography and avaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 1-2, p. 104-109, 2004.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S. P.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; CASTRO, S. L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **eCAM**, in press 2007.

SALOMÃO, K.; SOUZA, L. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Brazilian green propolis: effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **eCAM**, doi:10.1093/ecam/nep014, p. 1-12, 2009.

SATOH, H.; MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; ASANUMA, H.; KAWAUCHI, S.; SEGUCHI, K.; KIKUCHI, M.; MURAI, M. Intravesical ultrasonography for tumor staging in an orthotopically implanted rat model of bladder cancer. **J Urol.**, v. 177, n. , p. 1169-1173, 2007.

SIDDIQUEE, K. A. Z.; TURKSON, J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. **Cell Res.**, v. 18, n. 2, p. 254 – 267. 2008.

SIEVEKING, D. P.; CUCKLE, A.; CELERMAJER, D. S.; MARTIN, K. C. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations. **JACC**, v. 51, n. 6, p. 660 - 668, 2008.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANCOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **J. Eth. Pharm.**, v.73, p. 243-249, 2000.

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

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANCOVA, V. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 7, n. 1, 2001.

SFORCIN, J. M.; OSRSI, R. O.; BANCOVA, 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.; PILLAI, K. K.; HUSSAIN, S. Z.; GIRI, D. K. Protective role of propolis against alcohol – carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 29, p. 76-81, 1997.

SHIMAZAWA, M.; CHIKAMATISU, S. ; MORIMOTO, N.; MISHIMA, S.; NAGAI, H.; HARA, H. 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.; SOUZA, M.;S.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. 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.; BUENO, P. C. P., GREGÓRIO, L. E.; SILVA, A.; ALBUQUERQUER, S.; BASTOS, J. K. 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.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. 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.; ELTZE, E.; SHAFER, K. L.; BURGER, H. 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.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V.; In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran- Pathologic Basis of Disease**. 8^a ed., China: Saunders Elsevier, p. 259- 330, 2009.

SONG, Y. S.; PARK, E. H.; JUNG, K. J.; JIN, C. Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch. Pharm. Res.**, v. 25, n. 4, p. 500-504, 2002.

SONG, Y. S.; JIN, C.; JUNG, K. J.; PARK, E. H. Estrogenic effect of ethanol and ether extracts of propolis. **J. Eth. Pharm.**, v. 82, p. 89-95, 2002.

SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESOY, M.; YUCEL, B.; YILMAZ, B.; The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **J. Eth. Pharm.**, v.102, p. 371-376, 2005.

SQUIRE, R. A.; SPORN, M. B.; BROWN, C. C.; SMITH, J. M.; WENK, M. L.; SPRINGER, S. Histopathological evaluation of the inhibition of rat bladder carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. **Cancer Res.**, v. 37, p. 2930- 2936, 1977.

SUZUKI, I.; HAYASHI, I.; TAKAKI, T.; GROVEMAN, D. S. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v.17, n. 5, p. 553-562, 2002.

SUGIMOTO, Y.; IBA, Y.; KAYASUGA, R.; KIRINO, Y.; NISHIGA, M.; HOSSEN, M. A.; OKIHARA, K.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H.; KAMEI, C. 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.

SZUMIŁO, J. Natural compounds in chemoprevention of esophageal squamous cell tumors--experimental studies. **Pol. Merkur Lekarski**, v. 26, n. 152, p. 156-161, 2009.

TAKAHASHI, T.; HABUCHI, T.; KAKEHI, Y., MITSUMORI, K.; AKAO, T.; TERACHI, T.; YOSHIDA, O. 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.; SUCU, N.; ERCAM, B.; UNLU, A.; ÇALIKOUGLU, M.; 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.

TING, A. H.; McGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B., The cancer epigenome- components and functional correlates. **Genes Dev.**, v. 20, p. 3215-3231, 2006.

TISCHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMAN, T.; SILVA, M.; GOSPODAROWISZ, D. The human gene for vascular endothelial growth factor. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 18, p. 11947-11954, 1991.

TEIXEIRA, E. W. ; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. **eCAM**, v. 2, n.1, p. 85-92, 2005.

TOSSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F. 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.; POPOVA, M.; BANCOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSEVETKOVA I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **eCAM**, v. 3, n. 2, p. 249- 254. 2006.

TURKYILMAZ, S.; AILHAN, E.; ERCIN, C.; VANIZOR, B. K.; KAKLIKKAYA, N.; ATES, B.; ERDOGAN, S.; TOPALOGLU, S. Effects of caffeic acid phenethyl ester on pancreatitis in rats. **J. Surg. Res.** In press 2007.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANNA, L. R. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159 – 163, 2004.

VERMEULEN. P.; GASPARINI , G.; FOX, S.; COLPAERT, C.; MARSON, L.; GION, M.; BELIEN, J.; DE WAAL, R. M.; VAN MARCK, E.; MAGNANI, E.; WEIDNER, N.; HARRIS, A.; DIRIX, L. Y. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. **Eur. J. Cancer.**, v. 38, p. 1564–1579, 2002.

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

VURAL, A.; POLAT, Z. A.; TOPALKARA, A.; TOKER, M.I.; ERDOGAN, H.; ARICI, M.K.; CETIN, A. The effect of propolis in experimental acanthamoeba keratitis. **Clin. Exp. Ophthalm.**, v. 35, p. 749- 754, 2007.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 147, n. 1, p. 9-19, 1995.

WENG, M. S.; LIAO, C. H.; CHEN, C. N.; WU, C. L.; LIN, J. K. 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.; JEONG, Y.J.; PARK, J.W.; KWON, T. K. 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.; JEONG, Y. J.; INOUE, H.; PARK, J. W.; KWON, T. K. 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.

XU, Q.; BRIGGS, J.; PARK, S.; NIU, G.; KORTYLEWSKI, M.; ZHANG, S.; GRITSKO, T.; TURKSON, J.; KAY, H.; SEMENZA, G. L.; CHENG, J.Q.; JOVE, R. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. **Oncogene**, v. 24, p. 5552- 5560, 2005.

YANG, J.; CHATTERJEE-KISHORE, M.; STAUGAITS, S. M.; NGUYEN, H. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. **Cancer Res.** v. 65, n.3, p. 939-947, 2005.

YAO, R.; LEMON, W. J.; WANG, Y.; GRUBBS, C. J.; LUBET, R. A.; YOU, M. Altered gene expression profile in mouse bladder cancers induced by hydroxybutyl(butyl)nitrosamine. **Neoplasia**, v.6, n. 5, p. 569–577, 2004.

YU, CY.; WANG, L.; KHANLETSKIY, A.; FARRAR, W.L.; LARNER, A.; COLBURN, N.H.; LI, J. J.; 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.; TAKATORY, S.; KOYAMA, T.; GODA, M.; IWATANI, Y.; DOI, S.; KAWASAKI, H. Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats. **Yakugaku Zasshi.**, v.127, n.12, p.2065-2073, 2007

Apêndices

APÊNDICE A - Protocolo para manipulação de carcinógeno

Rotina e Protocolo Laboratorial Manipulação do carcinógeno OHBBN

- **Ações em caso de contaminação acidental**
 - **Primeiros Socorros**

Nome Químico : N-n-butyl-N-butan-4-ol-nitrosamina

Número do catálogo : B0938

Sinônimo: 1-Butanol, 4-(Butylnitrosamina)-(9Cl)

Fórmula química: CH₃(CH₂)N[(CH₂)OH]NO

Número CAS: 3817-11-6

Quantidade total de Carcinógeno: 125 gramas, distribuídos em 5 garrafinhas com 25 gramas, apresentação líquida a 97%. Não há discriminação da densidade.

Local e condições de armazenamento: Laboratório de Cirurgia Experimental. Refrigerado entre 4 e 10 °C.

Tempo em que será realizada a diluição: 14 semanas, segundas, quartas e sextas feiras.

Pesquisador que irá manipular a droga: Conceição Aparecida Dornelas - aluna do doutorado em cirurgia, sob orientação Professor Manoel Odorico de Moraes.

Rotina para o preparo da solução, diluição do carcinógeno a 0,05% em água destilada :

A manipulação do OHBBN (diluição em água corrente) será realizada em capela de fluxo laminar Classe II B2 com exaustor externo mecânico.

Apenas um frasco contendo o carcinógeno será levado do laboratório de microcirurgia até o laboratório da manipulação, no prédio da Anatomia Patológica (segundo andar).

Este frasco será acondicionado em recipiente de isopor contendo gelo e no interior de saco plástico que será colocado em sacola plástica para facilitar a movimentação, sem tropeços e trepidações.

1. Ao dar entrada no laboratório, imediatamente a sacola será colocada sobre mesa previamente forrada com plástico grosso (1,8 mm) na sala onde ocorrerá a manipulação.
2. Sobre essa mesa será colocada uma caixa especial para descarte de material, montada e aberta, contendo saco plástico.
3. Também uma folha de papel toalha absorvente dobrada.
4. A seguir será realizada paramentação do pesquisador na seguinte ordem:
 - 1° Calçar luvas de látex.
 - 2° Colocar óculos protetores.
 - 3° Touca cirúrgica.
 - 4° Pijama protetor de manga e calça em peça única.
 - 5° Vestir pijama de poliestireno sobre o pijama protetor
 - 6° Calçar botas protetoras de borracha.
 - 7° Colocar propés.
 - 8° Colocar máscara respiradora adequada com carvão ativado.
 - 9° E finalmente luvas de borracha com cano longo.

5. O fluxo será então ligado após a forração de seu assoalho com plástico grosso (1,8 mm).
6. Pipetas
7. Recipiente contendo água destilada no volume de 1 litro para diluição a 2,5% , e posteriormente 100 ml desta diluição para o conteúdo de água corrente necessário para uma diluição de 0,05% na quantidade necessária para os animais nas segundas, quartas e sextas- feiras. Será colocado no interior do fluxo e destampado.
8. O frasco contendo garrafinha de carcinógeno será colocado sob o fluxo.
9. A garrafinha será retirada do frasco, que será a seguir aberto com duas mãos.
10. Segurando o frasco com a mão esquerda e pegando a pipeta com a mão direita será então introduzida a ponta da pipeta no conteúdo previamente calculado e aspirado, sendo imediatamente colocado no recipiente com água destilada.
11. A pipeta será imediatamente descartada sobre papel toalha.
12. E a garrafinha fechada cuidadosamente e colocada no frasco protetor, tampada e recolocada no isopor com gelo.
13. O recipiente será fechado e colocado sobre a mesa.
14. O forro será então dobrado cuidadosamente, pegando as duas pontas da direita e unindo as pontas da esquerda, englobando papéis toalhas e pipetas descartáveis sendo logo colocado dentro de saco preto na caixa de descarte. Esta a seguir será fechada e conduzida para incinerador.
15. O fluxo deverá permanecer ligado por 15 minutos, ligando-se o UVA por 30 minutos.
16. A paramentação será então desfeita na forma inversa do realizado previamente. Em caso de não ocorrer qualquer gotejamento fora dos frascos e recipiente, serão descartados propés, touca e luvas de látex. Os demais serão colocados em bolsa plástica, para serem reutilizados.
 - 1º Retirar luvas de borracha com cano longo.
 - 2º Retirar máscara respiradora adequada com carvão ativado.
 - 3º Retirar propés.
 - 4º Retirar botas protetoras de borracha.
 - 5º Retirar cobertura da roupa com jaleco e avental plástico.
 - 6º Retirar óculos protetores e toca cirúrgica.
 - 7º Retirar luvas de látex.
17. Em caso de acidentes, gotejamento em roupa ou fora dos recipientes, estes serão descartados e incinerados.
18. Em caso de acidente, derramamento de carcinógeno, a chefe do laboratório será avisada e será adotado o procedimento a seguir: Paramentação imediata conforme item 4. Acesso a Maleta de Segurança contendo: a solução neutralizante e papéis absorventes.

Solução para neutralização do carcinógeno:

- A descontaminação, caso ocorra, será feita por oxidação com solução de permanganato de potássio em ácido sulfúrico, conforme método em anexo, Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) (CASTEGNARO, 1984). A solução será manipulada pela Dra. Adriana, do setor de controle de qualidade da Farmácia Escola (UFC), que já dispõe dos sais PA, sob sua guarda; telefone 3366 8224.

N-nitrosaminas não diluídas

1. Dissolver a N-nitrosamina em solução de ácido sulfúrico 3 mol/L
2. Adicionar permanganato de potássio em quantidade suficiente para obter uma solução de pelo menos 0,3 mol/L e garantir a permanência da cor roxa depois do tempo de reação.
3. Deixar reagindo a temperatura ambiente durante pelo menos 8 horas. Se possível, aguardar um período maior, como da noite para o dia.
4. Verificar se a destruição foi completa; manual “Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some N-nitrosamines”, página 20.
5. Diluir com água

Resíduos aquosos

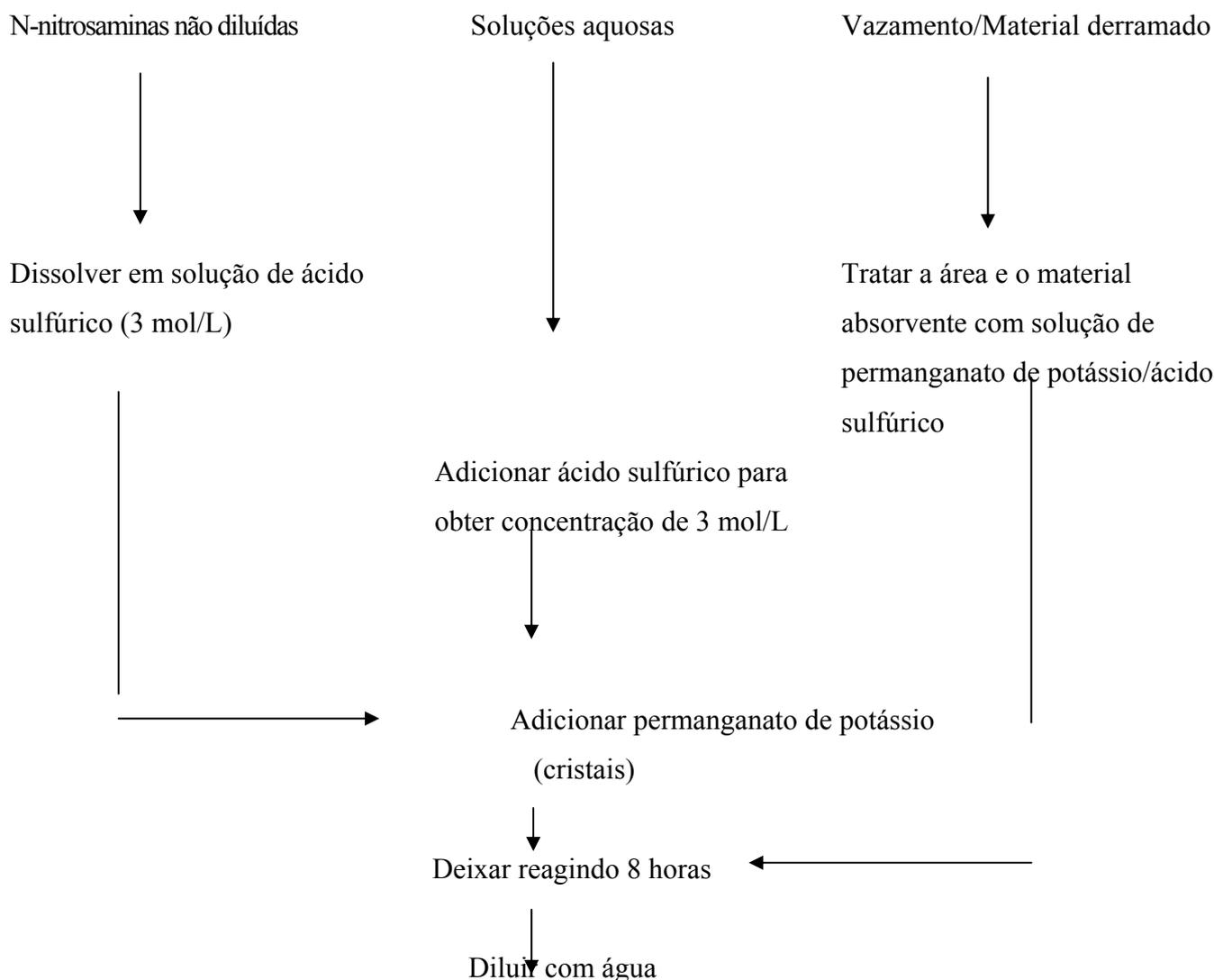
1. Ao resíduo imerso em banho de água fria, juntar lentamente, com agitação, ácido sulfúrico suficiente para obter uma solução na concentração de 3 mol/L.
2. Adicionar permanganato de potássio em quantidade suficiente para obter uma solução de pelo menos 0,3 mol/L e garantir a permanência da cor roxa depois do tempo de reação.
3. Deixar reagindo a temperatura ambiente durante pelo menos 8 horas. Se possível, aguardar um período maior, como da noite para o dia.
4. Diluir com água

Derramamento/vazamento de soluções aquosas

1. Isolar a área e vestir roupas de proteção apropriadas ao caso, usando inclusive aparelho de respiração, se necessário.
2. Absorver a substância derramada com material absorvente – como papel mata-borrão, por exemplo, colocar num béquer e adicionar solução de permanganato de potássio em ácido sulfúrico, deixando a noite toda.

3. Derramar um pouco de solução de permanganato de potássio/ácido sulfúrico sobre a área contaminada. Fechar a área e deixar da noite para o dia.
4. Verificar se ocorreu contaminação residual da atmosfera com N-nitrosaminas voláteis.
5. Adicionar carbonato de sódio para descontaminar a superfície.
6. Remover a descontaminação da mistura absorvendo com material absorvente.
7. Verificar se a descontaminação da superfície e do material absorvente foi completa.

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO



10. ORIGEM DO MÉTODO

Agência Internacional para Pesquisa do Câncer

Primeiros Socorros

Medidas de Primeiros Socorros

Obs.: As medidas abaixo relacionadas encontram-se descritas no MSDS cópia anexa enviada pela TCI América.

Contato com olho - Remova qualquer tipo de lentes de contato. Em caso de contato, lave imediatamente os olhos com muita água por pelos menos alguns minutos.

Contato com a pele - Em caso de contato, lave imediatamente com muita água. Cubra a pele irritada com um emoliente. Remova roupas e sapatos contaminados. Lave a vestimenta antes de reusar. Limpe minuciosamente os sapatos antes de reusá-los.

Inalação – Se a vítima não está respirando, faça respiração boca a boca. Afrouxe roupas apertadas como colarinho, cinto, gravata, e se está respirando com dificuldade, oxigênio pode ser administrado.

Ingestão - Induza vômito colocando o dedo na garganta. Abaixar a cabeça para que o vômito não reentre na boca e garganta. Afrouxe roupas apertadas, como colarinho, cinto, gravatas. Se a vítima não está respirando, faça respiração boca a boca. Examine lábios e boca para ter certeza se há tecidos danificados, uma possível indicação de que o material foi ingerido; a ausência de tais sinais, contudo, não é conclusiva.

Tratamento médico: Trate sintomaticamente e com medidas de suporte clínico.

Limite de exposição - Este produto químico é classificado como carcinógeno. Não há limite aceitável para exposição ao carcinógeno.

EM CASO DE FOGO E EXPLOSÃO

Produtos de combustão - Estes produtos são óxidos de carbono tóxicos (CO, CO₂) e óxidos de nitrogênio (NO, NO₂).

Média de luta com o fogo

– PEQUENO INCÊNDIO: Use pó químico seco.

APÊNDICE B – TABELA DE MÉDIAS DE PESOS E CONSUMO DE PRÓPOLIS POR GRUPOS

TABELA DE MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS
16 de outubro de 2006 a 1 de junho de 2007

| G | 16/10 | 27/10 | 03/11 | 17/11 | 01/12 | 15/12 | 29/12 | 12/01 | 26/01 | 09/02 | 23/02 | 09/03 | 23/03 | 06/04 | 20/04 | 04/05 | 18/05 | 01/06 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G1 | 66,0 | 102,0 | 124,4 | 158,0 | 172,6 | 186,0 | 199,6 | 204,0 | 214,2 | 216,4 | 213,8 | 227,2 | 227,6 | 222,4 | 236,6 | 238,0 | 229,9 | 230,7 |
| | 64,0 | 100,6 | 121,8 | 151,0 | 165,4 | 185,6 | 199,2 | 204,8 | 207,4 | 212,0 | 215,2 | 223,9 | 226,6 | 222,0 | 229,6 | 230,0 | 225,6 | 226,8 |
| G2a | | 065,4 | 094,4 | 134,7 | 155,8 | 170,0 | 186,7 | 197,8 | 202,7 | 206,0 | 213,0 | 220,7 | 225,0 | 260,6 | 231,0 | 233,0 | 228,4 | 227,5 |
| G2b | | 070,0 | 094,3 | 127,6 | 153,1 | 164,5 | 180,0 | 189,1 | 194,3 | 199,5 | 207,0 | 212,3 | 216,6 | 215,7 | 221,4 | 224,5 | 219,4 | 221,3 |
| G3 | | 068,6 | 098,0 | 136,2 | 161,8 | 182,4 | 193,2 | 201,6 | 208,2 | 209,8 | 215,8 | 227,8 | 226,0 | 227,4 | 220,4 | 235,0 | 228,6 | 234,7 |
| | | 059,0 | 097,6 | 134,6 | 158,6 | 180,0 | 191,0 | 210,6 | 204,6 | 207,0 | 215,6 | 220,2 | 222,4 | 223,8 | 228,4 | 229,6 | 227,5 | 231,2 |
| G4 | | 056,8 | 111,4 | 136,6 | 162,4 | 170,0 | 188,9 | 201,6 | 199,6 | 205,2 | 214,4 | 213,8 | 220,6 | 220,0 | 237,2 | 243,3 | 238,5 | 235,2 |
| | | 054,6 | 108,6 | 134,8 | 165,6 | 182,0 | 196,4 | 207,2 | 204,0 | 210,4 | 215,8 | 229,4 | 232,8 | 230,0 | 235,0 | 242,6 | 246,0 | 249,0 |
| G5 | | 070,2 | 104,6 | 133,6 | 159,4 | 170,0 | 183,4 | 197,0 | 195,2 | 202,0 | 207,2 | 215,4 | 217,8 | 216,0 | 233,8 | 233,0 | 228,8 | 276,0 |
| | | 070,0 | 100,0 | 136,2 | 158,6 | 174,5 | 185,2 | 198,8 | 200,6 | 205,2 | 210,0 | 218,6 | 220,6 | 217,0 | 215,9 | 227,4 | 219,6 | 227,8 |
| G6 | | 073,0 | 094,8 | 137,6 | 160,4 | 178,0 | 190,6 | 203,2 | 195,8 | 210,6 | 216,0 | 221,9 | 223,0 | 226,2 | 223,4 | 233,9 | 230,8 | 234,6 |
| | | 068,0 | 100,0 | 138,0 | 162,2 | 182,8 | 199,2 | 208,0 | 203,6 | 216,0 | 207,6 | 235,6 | 228,6 | 230,0 | 242,0 | 244,2 | 293,2 | 246,0 |
| G7 | | 100,0 | 100,0 | 133,8 | 159,0 | 178,4 | 189,8 | 201,8 | 197,6 | 205,8 | 216,2 | 222,6 | 227,4 | 228,0 | 232,0 | 234,4 | 293,0 | 289,0 |
| | | 094,0 | 094,0 | 131,2 | 152,4 | 176,0 | 187,2 | 202,8 | 191,6 | 200,2 | 198,4 | 217,2 | 220,7 | 216,0 | 219,0 | 230,6 | 257,0 | 241,0 |
| G8 | | 092,5 | 092,5 | 123,2 | 162,6 | 170,4 | 181,2 | 190,6 | 198,6 | 202,4 | 210,2 | 216,0 | 221,6 | 217,6 | 222,0 | 216,4 | 215,5 | 219,0 |
| | | 092,8 | 092,8 | 135,8 | 156,0 | 184,2 | 192,2 | 206,2 | 214,0 | 219,9 | 223,6 | 224,8 | 233,8 | 229,2 | 227,6 | 291,6 | 234,0 | 241,8 |
| G9 | | | | | | 169,8 | 183,4 | 194,4 | 191,8 | 197,0 | 203,6 | 212,0 | 206,0 | 214,6 | 230,8 | 225,4 | 237,2 | 220,4 |
| | | 095,0 | 095,0 | 132,4 | 162,6 | 176,8 | 190,4 | 205,8 | 197,6 | 200,4 | 207,0 | 216,0 | 219,8 | 221,2 | 226,6 | 233,0 | 233,0 | 228,8 |
| | | 096,0 | 096,0 | 135,4 | 155,0 | 177,0 | 188,2 | 206,0 | 203,4 | 210,2 | 218,8 | 224,0 | 224,9 | 223,6 | 228,8 | 278,8 | 229,2 | 234,2 |
| | | | 101,0 | 138,4 | 164,6 | 176,4 | 186,6 | 199,4 | 196,8 | 204,4 | 209,6 | 217,0 | 217,8 | 217,6 | 229,2 | 229,4 | 233,8 | 226,4 |
| G10 | | 103,0 | 103,0 | 146,2 | 172,0 | 165,3 | 196,0 | 211,1 | 214,0 | 219,0 | 226,1 | 229,0 | 281,2 | 228,7 | 234,0 | 238,3 | 236,0 | 241,8 |
| G11 | | | | | | | | | | | 092,0 | 145,0 | 161,6 | 172,8 | 139,0 | 193,3 | 197,0 | 201,5 |
| G12 | | 098,0 | 100,0 | 139,8 | 168,5 | 182,6 | 182,6 | 203,6 | 211,16 | 209,2 | 221,0 | 227,0 | 231,4 | 228,4 | 239,4 | 236,2 | 235,5 | 230,0 |
| G13 | | | | | | | | | | | 93,16 | 140,0 | 163,1 | 228,8 | 182,0 | 199,0 | 195,0 | 209,6 |

TABELA DE MÉDIAS DE PESOS DOS GRUPOS
2 de junho de 2007 a 16 de novembro de 2007

| GRUPO | 15/06 | 29/06 | 13/07 | 27/07 | 19/08 | 24/08 | 07/09 | 21/09 | 05/10 | 19/10 | 02/11 | 16/11 | Total |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GI | 188,8 | 239,6 | 244,0 | 243,0 | 245,6 | | | | | | | | |
| | 234,6 | 236,4 | 239,0 | 218,0 | 238,0 | | | | | | | | |
| GIIA | 261,5 | 242,0 | 244,0 | 225,6 | 238,1 | | | | | | | | |
| GIIB | 227,0 | 230,3 | 232,0 | 213,6 | 234,8 | | | | | | | | |
| GIII | 243,7 | 242,7 | 242,0 | 227,0 | 255,3 | | | | | | | | |
| | 230,2 | 231,6 | 230,4 | 222,8 | 233,2 | | | | | | | | |
| GVIII | 221,2 | 224,2 | 230,7 | 250,0 | 250,0 | | | | | | | | |
| | 242,4 | 245,8 | 248,6 | 247,6 | 234,0 | | | | | | | | |
| GX | 242,3 | 244,5 | 242,8 | 235,3 | 250,0 | | | | | | | | |
| GXI | 216,9 | 213,3 | 217,6 | 220,0 | 226,8 | | | 228,0 | 232,0 | 236,1 | 235,0 | 239,8 | |
| GXII | 237,8 | 241,6 | 247,4 | 241,4 | 250,2 | | | | | | | | |
| GXIII | 212,0 | 213,8 | 219,3 | 223,1 | 235,6 | | | 228,6 | 248,8 | 266,8 | 262,0 | 258,1 | |
| GK | 233,0 | 238,1 | 241,2 | 291,4 | 229,0 | | | | | | | | |
| GL | 224,0 | 230,1 | 233,0 | 192,0 | 231,0 | | | | | | | | |
| GM | 228,0 | 230,2 | 217,0 | 234,1 | 235,0 | | | | | | | | |
| GN | 240,0 | 228,7 | 250,0 | 211,3 | 224,0 | | | | | | | | |

TABELA DE CONSUMO DE PRÓPOLIS E LISINA PARCIAL A CADA DUAS SEMANAS POR GRUPO (mg)
16 de outubro de 2006 a 01 de junho de 2007

| GRUPO | 16/10 | 27/10 | 03/11 | 17/11 | 01/12 | 15/12 | 29/12 | 12/01 | 26/01 | 09/02 | 23/02 | 09/03 | 23/03 | 06/04 | 20/04 | 04/05 | 18/05 | 01/06 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G1 (P) | 686 | 1024 | 1302 | 1652 | 1806 | 1946 | 2030 | 2142 | 2240 | 2688 | 2338 | 2380 | 2380 | 2338 | 2478 | 2492 | 2394 | 2408 |
| | 672 | 1050 | 1274 | 1582 | 1736 | 1946 | 2044 | 2142 | 2170 | 2226 | 2254 | 2338 | 2366 | 2324 | 2352 | 2408 | 2366 | 2380 |
| G2a (P) | | | 1386 | 1680 | 2296 | 2142 | 2730 | 2884 | 2968 | 3024 | 3122 | 3318 | 3304 | 2422 | 3388 | 3416 | 2394 | 3332 |
| G3 (P) | | | 1022 | 1428 | 1694 | 1904 | 2016 | 2534 | 2184 | 2184 | 2254 | 2380 | 2366 | 2380 | 3352 | 2464 | 2394 | 2744 |
| | | | 1022 | 1400 | 1666 | 1890 | 2002 | 2156 | 2142 | 2170 | 2254 | 2310 | 2324 | 2338 | 2394 | 2394 | 2380 | 2422 |
| G4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G8(P) | | | 1162 | 1288 | 1596 | 1778 | 1890 | 1988 | 2086 | 2114 | 2198 | 2268 | 2324 | 2282 | 2324 | 2268 | 2254 | 1438 |
| | | | 966 | 1414 | 1708 | 1932 | 2016 | 2156 | 2240 | 2296 | 2338 | 2352 | 2338 | 2394 | 2408 | 2520 | 2450 | 2534 |
| G9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| G10 (Li) | | | 1288 | 1834 | 2170 | 2310 | 2464 | 2646 | 2478 | 2758 | 2366 | 2394 | 3548 | 2394 | 2940 | 2996 | 2968 | 3024 |
| G11 (P) | | | | | | | | | | 924 | 2744 | 1512 | 2030 | 2170 | 1750 | 2646 | 2478 | 2520 |
| G12 (Li) | | | 1470 | 1498 | 1582 | 2282 | 1890 | 2548 | 2688 | 2632 | 2310 | 2380 | 2422 | 2394 | 2450 | 2478 | 2464 | 2492 |

P – Própolis, L – Lisina 150 mg/kg peso, mg - miligramas

TABELA DE CONSUMO DE PRÓPOLIS E LISINA E CELECOXIBE PARCIAL A CADA DUAS SEMANAS POR GRUPO (mg)
2 de junho de 2007 a 16 de novembro de 2007

| GRUPO | 15/06 | 29/06 | 13/07 | 27/07 | 19/08 | 24/08 | 07/09 | 21/09 | 05/10 | 19/10 | 02/11 | 16/11 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GI (P) | 1974 | 2512 | 2564 | 2551 | 3280 | | | | | | | |
| | 2483 | 2482 | 2509 | 2289 | 2943 | | | | | | | |
| GIIA (P) | 3931 | 3557 | 3587 | 2842 | 3654 | | | | | | | |
| GIII (P) | 2080 | 2039 | 2039 | 1907 | 2213 | | | | | | | |
| | 2416 | 2431 | 2419 | 2339 | 3008 | | | | | | | |
| GVIII (P) | 1858 | 1883 | 1455 | 1449 | 1863 | | | | | | | |
| | 2545 | 2580 | 2610 | 2599 | 3342 | | | | | | | |
| GX (Li) | 3052 | 3080 | 3059 | 2709 | 3160 | | | | | | | |
| GXI (P) | 2724 | 2687 | 2734 | 2792 | 3564 | | | 6090 | 2376 | 2506 | 2495 | 2538 |
| GXII (Li) | 2622 | 2536 | 2597 | 2538 | 3258 | | | | | | | |
| GXIII | | | | | | | | | | | | |
| GK | | | | | | | | | | | | |
| GL (LiLi) | 12230 | 12558 | 11240 | 8911 | 12731 | | | | | | | |
| GM (cel) | 1149 | 1160 | 1002 | 983 | 1509 | | | | | | | |
| GN (PP) | 13104 | 12448 | 13650 | 10650 | 12170 | | | | | | | |

P – Própolis 150 mg/kg/ peso , L – Lisina 150 mg/kg peso, LiLi- Lisina 300 mg/kg peso, Cel – Celecoxibe, PP- Própolis 300 mg/kg peso, mg – miligrama

PÊNDE C – TABELAS PARA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE CARCINOGENESE

Inibição da angiogênese e quimioprevenção da carcinogênese pela própolis verde extraída em L-lisina versus promoção da carcinogênese com estímulo da angiogênese pela L-lisina em tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratos Wistar

GRUPO _____ RATO _____ PAPILOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS, HIPERPLASIA SIMPLES (PLANA), PAPILAR E NODULAR, LESÃO DE BAIXO GRAU. Lesões por bexiga

| MICROSCOPIA | | | | | | | | | | | | | MACRO-GERAL | | | | | |
|-------------|------------------------------|--------------|-----------|---------------------|---------------------|----------------|------|-----------|-----------|---------------------|--------|-------------------------------|-------------|-----------|------|--------------------------------------|------|----------------|
| Escore | Hiperplasia Simples | | | Hiperplasia Papilar | Hiperplasia Nodular | Atipias 1 a 3+ | | Papiloma | | Lesão de Baixo Grau | T | Lesões Associadas: Metaplasia | | | | Hiperplasia Epitelial Da Pelve Renal | | Tu Pelve Renal |
| | Escore inicial 0 | | | Es Ini 6+ | Es Ini 6+ | | | Es Ini 12 | Es Ini 15 | | | Escamosa | | Glandular | | | | |
| | Número de camadas de células | | | | | | | | | | | s/at | c/at | s/at | c/at | s/at | c/at | |
| lesões | 4 a 7 1+ | 7 a 10 2+ | >10 3+ | 3+ | 3+ | s/at | c/at | Ex | End | c/at | Invas? | | | | | | | |
| 1. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

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 HEMorragia CCT carcinoma de células transicionais ADENOCARCINOMA Glandular ESCamoso Pseudoglandular HP hiperplasia renal c/ atipia s/atipia CCT carcinoma de células transicionais Escamoso Glandular Hiperplasia. T Total. Es Ini – Escore Inicial

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

ATIPIAS

Aumento da celularidade
 Células gigantes
 Hiperplasia nuclear
 cléolo proeminente
 Pleomorfismo celular
 Pleomorfismo nuclear
 Presença de mitoses
 Qualquer uma delas 1+ Se todas 2 + (mais de 1 ou todos leve a moderado e 3 + Se todos e intensidade acentuada)

FLAMAÇÃO

1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

Única – lesão isolada () Focal – menos de 1/3 da mucosa total () Difusa – mais de 1/3 da mucosa total ()
 Observador: _____ DATA _____

Inibição da angiogênese e quimioprevenção da carcinogênese pela própolis verde extraída em L-lisina versus promoção da carcinogênese com estímulo da angiogênese pela L-lisina em tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratos Wistar

SÍNTESE POR BEXIGA

GRUPO _____ RATO _____
 Observações _____

CONCLUSÃO DOS ESCORES POR BEXIGA

| LESÕES | Número de lesões Escolha do maior escore da lesão | | Escolha de maior escore da Bexiga | | T | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------|--------|--|
| | Escores | + Escore de Partida | Escore | + Escore inicial | | |
| | n ^o 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 | | | | | | |

Referência:

IARC – International Classification of rodent tumours. Part I: The rat. 3- urinary system.
IARC scientific publication, v. 122, p. 1-46, 1992.
 SQUIRE, R. A.; SPORN, M. B.; BROWN, C. C.; SMITH, J. M. WENK, M. L.
 SPRINGER, S. Histopatological evaluation of the inhibition of rat bladder carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. **Cancer Res.**, v. 37, p. 2930- 2936, 1977.
 OYASU, R. Epithelial Tumors of de Lower Urinary tract in humans and rodents. **Fd Chem. Tox.**, v. 33, n. 9, p. 747-755. 1995.
 BRYAN, G. T. ; COHEN, S. M. **The pathology of bladder cancer**. Boca Raton: CRC Pres Inc, v.II, 1984, 283 p.

Inibição da angiogênese e quimioprevenção da carcinogênese pela própolis verde extraída em L-lisina versus promoção da carcinogênese com estímulo da angiogênese pela L-lisina em tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas Wistar.

PAPILOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS, HIPERPLASIA SIMPLES (PLANA), PAPILAR E NODULAR **Síntese do Grupo**

GRUPO _____

MICROSCOPIA

| Escore | Hiperplasia Simples Escore inicial 0 | | | Hiperplasia Papilar Es Ini 6+ | Hiperplasia Nodular Es Ini 6 | Papiloma | | Atipias 1+ a 3+ | | Lesão de Baixo Grau Es Ini 15 | | T | Lesões Associadas: Metaplasia | | | | Hiperplasia Epitelial Da Pelve Renal | | Tu Pelve Renal |
|--------|-----------------------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|---------------------------------|----------|-----|--------------------|------|----------------------------------|--------|---|-------------------------------|------|-----------|------|--------------------------------------|------|----------------|
| | Número de camadas de células | | | | | Ex | End | s/at | c/at | c/at | Invas? | | Escamosa | | Glandular | | s/at | c/at | |
| | 4 a 7 1+ | 7 a 10 2+ | >10 3+ | | | | | | | | | | s/at | c/at | s/at | c/at | | | |
| RATOS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Observação: OS VALORES DE CADA RATO CORRESPONDE A LESÃO DE MAIOR ESCORE ALCANÇADO POR BEXIGA ATÍPIAS

Aumento da celularidade

Células gigantes

Hipercromasia nuclear

Nucléolo proeminente

Pleomorfismo celular

Pleomorfismo nuclear

Presença de mitoses

Qualquer uma delas 1+ Se todas 2+ (mais de 1 ou todos leve a moderado e 3+ Se todos e intensidade acentuada

Única – lesão isolada ()

Focal – menos de 1/3 da mucosa total ()

Difusa – mais de 1/3 da mucosa total ()

Observador: _____ Data: _____

Inibição da angiogênese e quimioprevenção da carcinogênese pela própolis verde extraída em L-lisina versus promoção da carcinogênese com estímulo da angiogênese pela L-lisina em tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas Wistar.

GRUPO _____
 CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS /ESCAMOSO/ADENOCARCINOMA/DIFERENCIAÇÃO:MISTO Síntese do Grupo

| MICROSCOPIA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------------------------------|---|---|-----------------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---|---------|-----|-----|---|---|---|---|------------------------|---|---|---------------------|---|---|------------|---|---|--------|-----|---------|----------------------------------------|-------|-----|-----|--------|-----|----------------------|-----------------------------|
| Escore | Gradação Histológica Escore inicial 18 | | | | | | | | | Invasão | | | | | | T | Subtipos de Carcinomas | | | | | | | | | Scor T | H e | N e A p | Lesões benignas Associadas Metaplasias | | Rim | | Ureter | | Papilar I Sólido III | Única I Focal II Difusa III |
| | 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 | | Puro | | | CCTc/ diferenciação | | | Misto CCT+ | | | | | | Esca | Gland | HP | CCT | HP | CCT | | |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | C | E | A | E | G | E | P | E | A | | | | E | | | | | | | |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | C | E | A | E | G | E | P | E | A | | | | E | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | | | | | | | | | |
| 1. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

DIFERENCIAÇÃO CELUares 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
 HEorragia CCT carcinoma de células trancionais ADENOCarcinoma Glandular ESCamoso Pseudoglandular HP hiperplasia renal Escamoso Glandular Hperplasia. T Total. Es Ini – Escore Inicial

Única – lesão isolada () Focal – menos de 1/3 da mucosa total () Difusa – mais de 1/3 da mucosa total ()
 Observador: _____ DATA _____

Aumento da celularidade
Células gigantes
Hipercromasia nuclear
Nucléolo proeminente
Pleomorfismo celular
Pleomorfismo nuclear
Presença de mitoses
 Qualquer uma delas 1+ Se todas 2+ (mais de 1 ou todos leve a moderado e 3+ Se todos e intensidade acentuada

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

INFLAMAÇÃO
 1+, 2+ e 3+

MONÓCITOS ()
 POLIMORFONUCLEARES ()

Inibição da angiogênese e quimioprevenção da carcinogênese pela própolis verde extraída em L-lisina versus promoção da carcinogênese com estímulo da angiogênese pela L-lisina em tumores de bexiga induzidos pelo BBN em ratas Wistar.

GRUPO _____

Observações _____

COMPARAÇÃO DA CONCLUSÃO DO SCORE POR RATO /GRUPO

MICROSCOPIA

| LESÃO RATO Nº | HIPERPLASIA SCORES | | | PAPILOMA | LESÃO DE BAIXO GRAU | | CARCINOMA CCT/ESCAMOSO/ADENO/COM DIFERENCIAÇÃO/ MISTO/ | CONCLUSÃO DO SCORE POR RATO /GRUPO SCORE |
|------------------|-----------------------|---------|---------|----------|---------------------|----------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| | SIMPLES PLANA | PAPILAR | NODULAR | | c/at | Invasão? | | |
| 1. | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | |
| 4. | | | | | | | | |
| 5. | | | | | | | | |
| 6. | | | | | | | | |
| 7. | | | | | | | | |
| 8. | | | | | | | | |
| 9. | | | | | | | | |
| 10. | | | | | | | | |
| 11. | | | | | | | | |
| 12. | | | | | | | | |
| 13. | | | | | | | | |

OBSERVAÇÕES:

**APÊNDICE D - DADOS BRUTOS DOS PESOS DE CORPO, FÍGADO, BAÇO E RINS
POR RATO E POR GRUPO**

GRUPO I - PESOS 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 223 | 6,98 | 0,74 | 1,74 |
| 291 | 8,81 | 1,09 | 1,94 |
| 209 | 8,18 | 1,17 | 2,73 |
| 240 | 6,76 | 0,71 | 1,61 |
| 220 | 7,56 | 0,93 | 2,51 |
| 229 | 7,37 | 0,82 | 2,00 |
| 220 | 6,18 | 0,61 | 1,42 |
| 245 | 7,88 | 0,86 | 2,06 |
| 251 | 6,86 | 0,60 | 1,76 |

GRUPO IIA - PESOS 40 semanas- Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 271 | 10,15 | 1,05 | 2,02 |
| 241 | 7,75 | 0,86 | 1,65 |
| 228 | 6,95 | 0,65 | 1,44 |
| 227 | 6,84 | 0,54 | 1,61 |
| 217 | 7,77 | 0,67 | 1,56 |
| 233 | 7,58 | 0,75 | 2,15 |
| 250 | 7,48 | 0,67 | 1,96 |

GRUPO IIB - PESOS 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

GRUPO III PESOS 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 237 | 7,63 | 0,74 | 1,37 |
| 249 | 5,86 | 0,57 | 1,46 |
| 175 | 5,04 | 0,42 | 1,17 |
| 217 | 5,76 | 0,65 | 1,45 |
| 257 | 8,02 | 0,81 | 1,61 |
| 274 | 7,62 | 1,61 | 1,53 |

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 276 | 8,73 | 2,49 | 2,24 |
| 234 | 7,17 | 0,83 | 2,79 |
| 256 | 7,17 | 0,83 | 1,45 |
| 276 | 4,92 | 0,62 | 1,35 |
| 221 | 5,81 | 0,53 | 1,97 |
| 241 | 7,30 | 0,92 | 1,97 |
| 251 | 7,30 | 0,92 | 1,97 |
| 209 | 5,97 | 0,64 | 1,75 |
| 269 | 5,91 | 0,59 | 1,27 |
| 256 | 7,58 | 0,50 | 1,75 |
| 230 | 8,81 | 2,08 | 1,63 |
| 207 | 7,20 | 0,91 | 1,73 |
| 221 | 6,30 | 0,72 | 1,49 |
| 217 | 6,94 | 0,63 | 1,61 |
| 254 | 6,41 | 0,33 | 1,62 |
| 233 | 7,40 | 0,74 | 1,73 |
| 226 | 6,70 | 0,87 | 2,75 |
| 243 | 7,24 | 0,52 | 1,50 |
| 245 | 7,68 | 0,69 | 1,62 |

GRUPO X PESOS 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 232 | 2,46 | 0,66 | 1,39 |
| 225 | 8,02 | 0,44 | 1,69 |
| 256 | 7,71 | 0,97 | 1,04 |
| 252 | 7,93 | 0,55 | 1,77 |
| 260 | 7,26 | 0,73 | 1,86 |
| 215 | 3,06 | 0,22 | 1,11 |

GRUPO XI PESOS 40 semanas Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 227 | 6,95 | 1,32 | 2,03 |
| 276 | 7,92 | 1,51 | 2,31 |
| 251 | 7,98 | 0,55 | 1,85 |
| 229 | 7,08 | 0,59 | 1,77 |
| 210 | 6,33 | 0,46 | 1,95 |
| 235 | 7,04 | 0,56 | 1,92 |

GRUPO XII PESOS 40 semanas Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 253 | 7,51 | 0,65 | 1,81 |
| 263 | 6,9 | 0,76 | 1,93 |
| 247 | 7,13 | 1,06 | 1,64 |
| 245 | 7,16 | 0,68 | 1,22 |
| 243 | 8,21 | 0,95 | 1,59 |

GRUPO XIII PESOS 40 semanas Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 255 | 8,17 | 0,73 | 2,73 |
| 220 | 6,55 | 0,52 | 2,01 |
| 244 | 7,32 | 0,54 | 2,02 |
| 235 | 6,16 | 0,48 | 2,31 |
| 236 | 7,20 | 0,46 | 2,44 |
| 262 | 7,31 | 0,55 | 2,50 |

GRUPO K PESOS 40 semanas Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 224 | 07,79 | 0,92 | 1,63 |
| 225 | 04,23 | 0,16 | 1,44 |
| 289 | 03,93 | 0,31 | 1,49 |
| 277 | 10,08 | 1,11 | 2,26 |
| 272 | 09,35 | 0,94 | 2,39 |
| 240 | 07,73 | 0,94 | 2,12 |
| 251 | 07,91 | 1,18 | 1,64 |
| 237 | 06,52 | 0,58 | 1,91 |
| 229 | 06,90 | 0,78 | 1,75 |
| 215 | 04,90 | 0,26 | 1,41 |
| 217 | 05,53 | 1,76 | 1,37 |
| 223 | 05,39 | 0,32 | 0,78 |
| 221 | 06,89 | 1,09 | 1,73 |

GRUPO L PESOS 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 205 | 7,92 | 0,59 | 1,47 |
| 214 | 6,56 | 0,65 | 1,73 |
| 247 | 8,04 | 0,74 | 1,46 |
| 161 | 5,45 | 0,45 | 1,24 |
| 202 | 6,47 | 0,69 | 1,51 |
| 267 | 8,48 | 0,89 | 2,22 |
| 240 | 8,52 | 0,91 | 1,91 |
| 227 | 5,95 | 0,25 | 1,70 |
| 239 | 7,92 | 0,59 | 1,40 |
| 240 | 5,33 | 0,45 | 1,36 |
| 186 | 6,23 | 0,61 | 1,44 |
| 205 | 7,81 | 0,59 | 1,88 |
| 256 | 9,20 | 0,63 | 1,97 |

GRUPO M 40 semanas - Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 232 | 8,57 | 0,83 | 2,08 |
| 257 | 8,88 | 0,68 | 2,23 |
| 236 | 8,33 | 0,78 | 1,30 |
| 157 | 4,88 | 0,14 | 1,19 |
| 201 | 6,20 | 0,73 | 2,08 |
| 255 | 8,21 | 0,75 | 1,74 |
| 246 | 6,56 | 0,22 | 1,45 |
| 207 | 5,88 | 0,38 | 1,44 |
| 220 | 7,30 | 0,57 | 1,58 |
| 240 | 8,12 | 0,82 | 1,64 |
| 233 | 6,80 | 0,76 | 1,64 |
| 234 | 8,30 | 0,49 | 1,62 |

GRUPO N 40 semanas Corpo, Fígado, Baço, Rins

| CORPÓREO | FÍGADO | BAÇO | RINS |
|----------|--------|------|------|
| 262 | 7,75 | 0,94 | 1,58 |
| 265 | 9,40 | 1,13 | 0,04 |
| 225 | 6,40 | 0,65 | 1,40 |
| 195 | 5,50 | 0,20 | 0,70 |
| 197 | 6,41 | 0,40 | 1,50 |
| 234 | 6,52 | 0,69 | 1,40 |
| 225 | 5,64 | 0,65 | 1,56 |
| 238 | 6,74 | 0,65 | 1,29 |
| 253 | 8,06 | 0,58 | 1,68 |
| 238 | 8,54 | 0,91 | 1,82 |
| 264 | 9,07 | 0,57 | 1,72 |
| 251 | 7,70 | 0,95 | 1,90 |
| 277 | 7,85 | 1,13 | 1,95 |

APÊNDICE E – DADOS BRUTOS DAS DIMENSÕES DAS IMAGENS NA 31ª E 40ª SEMANAS.

CORRELAÇÃO COM MACROSCOPIA E MICROSCOPIA POR RATO E POR GRUPO

TABELAS COM IMAGENS DE ULTRASSONOGRRAFIA DE BEXIGA DOS ANIMAIS COM 30 E 40 SEMANAS PÓS INÍCIO DO BBN
CORRELAÇÃO COM MACROSCOPIA E MICROSCOPIA

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|---------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,206 | 0,337 | 0,307 | 0,333** | | | x | | x | x | x | |
| 2. | SI | SI | SI | SI | | | x | | x | x | | |
| 3. | 0,199 | 0,344 | 0,384 | 0,826** | | | x | | x | x | x | |
| 4. | 0,152 | 0,180** | 1,010 | 0,970** | | | x | | x | | | x |
| 5. | 0,120 | 0,897 | 1,270 | 1,480** | | | | x | x | x | | x |
| 6. | SI | SI | 0,258 | 0,392** | | | x | | x | x | x | |
| 7. | SI | SI | 0,521 | 0,580** | | | x | | x | | x | |
| 8. | 0,106 | 0,284 | 0,480 | 0,380** | | | | x | x | x | x | |
| 9. | 0,072 | 0,153 | 0,208 | 0,288 | | | x | | x | x | | |
| 10. | SI | SI | 0,267 | 0,218** | | | x | | x | x | x | |

SI – Sem imagem tumoral, U- Única, F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|-------------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| GRUPO/RATO IIA | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,521 | 0,557** | 1,020 | 1,210** | | | x | | x | x | | x |
| 2. | 0,123 | 0,139 | 0,251 | 0,430** | | | x | | x | x | x | |
| 3. | 0,096 | 0,120 | 0,220 | 0,314** | | | x | | x | x | | |
| 4. | 0,285 | 0,449** | 0,655 | 1,538 | | | x | | x | x | x | |
| 5. | SI | SI | 1,390 | 1,930** | | | x | | x | x | x | |
| 6. | 0,343 | 0,743** | Óbito | | | | x | | x | x | | x |
| 7. | 0,216 | 0,684 | 0,167 | 0,330 | | | x | | x | x | x | |

SI – Sem imagem tumoral, U- Única, F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|---------------|------------|---------|--------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,219 | 0,441 | 0,293 | 0,625** | | | x | | x | x | | |
| 2. | 0,114 | 0,171 | 0,692 | 0,797** | | | x | | x | x | | |
| 3. | 0,427 | 0,631** | 0,902 | 1,570 | | | | x | x | | | x |
| 4. | SI | SI | 0,149 | 1,164** | | | x | | x | | | |
| 5. | SI | SI | 0,156 | 0,398** | | | x | | x | | | |
| 6. | SI | SI | Espessamento | | | | x | | x | x | | |

SI – Sem imagem tumoral , U- Única , F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|-------------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|-----|---|
| GRUPO/RATO III | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,216 | 0,601 | 0,214 | 0,252 | | | x | | x | x | x | |
| 2. | 0,244 | 0,390 | 0,455 | 0,506** | | | x | | x | x | x | |
| 3. | 0,124 | 0,166 | 0,300 | 0,228** | | | x | | x | | x # | |
| 4. | 0,436 | 0,806** | Óbito | | | | | x | x | x | x | x |
| 5. | 0,786 | 1,570** | Óbito | | | | | x | x | x | x | x |
| 6. | 0,114 | 0,404** | 0,748 | 1,290 | | | | x | x | x | x | x |
| 7. | 0,150 | 0,409 | 0,218 | 0,313 | | | x | | x | x | | |
| 8. | 0,286 | 0,409 | 0,533 | 0,626** | | | x | | x | x | x | x |
| 9. | 0,377 | 0,499 | 0,482 | 0,709** | | | x | | x | x | x | |
| 10. | 0,650 | 0,826 | 1,320 | 1,330** | | | | x | x | x | x | x |

SI – Sem imagem tumoral, U- Única, F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais), # BM no rim

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|--------------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| GRUPO/RATO VIII | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,229 | 1,040** | Óbito | | | | | x | x | x | x | x |
| 2. | 0,168 | 1,780 | 0,076 | 1,178 | | | x | | x | x | x | |
| 3. | 0,634 | 0,747** | 0,120 | 1,250** | | | | x | x | x | x | x |
| 4. | 0,116 | 0,218 | 0,275 | 0,345** | | | x | | x | x | x | |
| 5. | Óbito | | | | | | | | | | | |
| 6. | 0,436 | 0,588 | 0,611 | 1,450 | | | | x | x | x | | x |
| 7. | 0,119 | 0,313 | 0,371 | 0,623 | | | x | x | | | | x |
| 8. | 0,136 | 0,168 | 0,503 | 0,825 | | | x | | x | x | | # |
| 9. | 0,440 | 0,596** | 0,631 | 0,825** | | | | x | x | x | | x |
| 10. | 0,541 | 0,584** | 0,432 | 0,912** | | | | x | x | x | | x |

Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais) , # o Tumor era no Rim

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|---------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,427 | 0,740 | 1,310 | 1,530** | | | | x | x | x | x | x |
| 2. | 0,370 | 0,660** | 0,600 | 1,130** | | | | x | x | x | | x |
| 3. | 0,609 | 0,813** | 0,731 | 1,320** | | | | x | | | | x |
| 4. | SI | SI | 0,120 | 0,256** | | | x | | x | | x | x |
| 5. | 0,290 | 0,588 | 0,646 | 0,735** | | | | x | | | x | x |
| 6. | 0,431 | 0,480 | óbito | | | | | | | | | * |

SI – Sem imagem tumoral , U- Única , F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

SI – Sem imagem tumoral , U- Única , F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|---------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,185 | 1,660 | 0,128 | 0,315 | | | x | | x | x | x | |
| 2. | 0,306 | 0,419 | 0,800 | 1,200 | | | x | | x | x | | x |
| 3. | 0,176 | 0,230 | Óbito | | | | | | | | | * |
| 4. | 0,150 | 0,206 | 0,283 | 0,458** | | | | x | x | x | | x |
| 5. | 0,085 | 0,119 | 0,080 | 0,257** | | | x | | x | x | x | x |
| 6. | SI | SI | 0,365 | 0,531 | | | x | | x | x | | |
| 7. | SI | SI | 0,123 | 0,204 | | | x | | x | x | | x |
| 8. | 0,176 | 0,360 | 0,356 | 0,360 | | | x | | x | x | | |
| 9. | SI | SI | 0,199 | 0,233 | | | x | | x | x | x | |
| 10. | 0,199 | 0,596 | 1,140 | 1,420** | | | | x | x | x | | x |
| 11. | 0,520 | 0,920** | 0,773 | 0,957** | | | | x | x | x | | x |
| 12. | 0,234 | 0,438 | Óbito | | | | | x | x | x | | x |
| 13. | SI | SI | 0,272 | 0,461** | | | x | | x | x | | x |

– Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|---------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,687 | 0,774** | 1,330 | 1,720** | | | | x | x | x | x | x |
| 2. | 0,290 | 0,374 | 0,632 | 0,669** | | | x | | x | x | | x |
| 3. | SI | SI | SI | SI | | | x | | x | x | | |
| 4. | 0,183 | 0,452 | Óbito | | | | | | | | | * |
| 5. | 0,010 | 0,001 | Óbito | | | | x | | x | x | | x |
| 6. | SI | SI | SI | SI | | | x | | x | x | | |
| 7. | 0,503 | 0,542** | Óbito | | | | | | | | | x |
| 8. | 0,117 | 0,270 | Óbito | | | | | | | | | * |
| 9. | 0,197 | 0,528 | 0,327 | 0,707** | | | x | | x | x | | x |
| 10. | 0,114 | 0,310 | 0,333 | 0,389 | | | | x | x | x | | x |
| 11. | 0,178 | 0,185 | 1,460 | 1,790 | | | | x | x | x | | x |
| 12. | SI | SI | Óbito | | | | x | | x | x | | x |
| 13. | SI | SI | SI | SI | | | x | | x | | | |

SI – Sem imagem tumoral, U- Única, F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | 30 SEMANAS | | 40 SEMANAS | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|-----------------|------------|---------|------------|---------|-------|---|---|---|-------|---|----|---|
| GRUPO/RATO M | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | |
| 1. | 0,133 | 0,194 | 0,270 | 0,451** | | | x | | x | x | | x |
| 2. | 0,090 | 0,145 | 0,160 | 0,232** | | | | x | x | x | | x |
| 3. | 0,289 | 0,485 | 0,546 | 0,827 | | | x | | x | x | | |
| 4. | 0,560 | 0,739** | Óbito | | | | | x | x | x | | x |
| 5. | 0,105 | 0,247 | 0,405 | 0,636** | | | | x | x | x | | x |
| 6. | SI | SI | SI | SI | | | | | | | | * |
| 7. | SI | SI | 0,697 | 0,697** | | | | x | x | x | x | x |
| 8. | 0,176 | 0,442** | Óbito | | | | | x | x | x | x | x |
| 9. | 0,289 | 0,338** | 0,882 | 0,936 | | | | x | x | x | | x |
| 10. | 0,212 | 0,808 | 0,322 | 0,494** | | | | x | x | x | x | x |
| 11. | 0,216 | 0,521** | 0,214 | 0,490 | | | | x | x | x | x | x |
| 12. | SI | SI | 0,369 | 0,441** | | | | x | | | | x |

SI – Sem imagem tumoral , U- Única , F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

| IDENTIFICAÇÃO | | 30 SEMANAS | | 40 | | MACRO | | | | MICRO | | | |
|-----------------|-----------|------------|-----------|---------|----|-------|---|---|---|-------|----|---|--|
| GRUPO/RATO N | DIÂMETROS | | DIÂMETROS | | SL | U | F | D | H | P | BM | M | |
| | MENOR | MAIOR | MENOR | MAIOR | | | | | | | | | |
| 1. | 0,152 | 0,283 | 0,452 | 0,991 | | | x | | x | x | | x | |
| 2. | SI | SI | 0,122 | 0,161** | | | x | | x | x | | | |
| 3. | 0,209 | 0,430** | 0,588 | 0,753** | | | | x | x | x | | x | |
| 4. | 0,468 | 0,650 | 0,976 | 1,700 | | | x | | x | x | x | x | |
| 5. | SI | SI | Óbito | | | | x | | x | x | | | |
| 6. | 0,197 | 0,253 | 0,647 | 1,460** | | | | x | x | x | | x | |
| 7. | 0,222 | 0,335 | 0,829 | 0,951** | | | | x | x | x | x | | |
| 8. | 0,114 | 0,141 | 0,283 | 0,440 | | | x | | x | x | x | | |
| 9. | SI | SI | 0,181 | 0,430** | | | | x | x | x | x | x | |
| 10. | 0,312 | 0,402 | 0,513 | 0,950** | | | | x | x | x | x | x | |
| 11. | 0,222 | 0,769 | 2,800 | 3,000** | | | | x | x | x | | x | |
| 12. | 0,100 | 0,280 | 0,410 | 0,431 | | | x | | x | x | | | |
| 13. | 0,119 | 0,205 | 0,677 | 1,300 | | | x | | x | x | x | x | |

SI – Sem imagem tumoral, U- Única, F- Focal, D- Difusa, H – Hiperplasia, P – Papiloma, BM, Lesão de baixo potencial maligno, M – Maligno ** Várias (+ de duas imagens tumorais)

APÊNDICE F1 - NÚMERO DE CARCINOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO E ATIPIAS POR RATO/ GRUPO

| GRUPO I RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5. | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |

| GRUPO IIA RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 2. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 |

| GRUPO IIB RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 4. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 |

| GRUPO III RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 3 |
| 4. | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 5. | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 8. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9. | 5 | 2 | 2 | 1 | 0 | 5 |
| 10. | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 11. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12. | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 13. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14. | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 15. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16. | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 17. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 26 | 13 | 6 | 7 | 6 | 20 |

| GRUPO X RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|--------------|----------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 |
| 2. | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| 3. | 4 | 2 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| 4. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5. | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| TOTAL | 17 | 5 | 1 | 11 | 6 | 11 |

| GRUPO K RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|--------------|----------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 3. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 4. | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9. | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 10. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 11. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 12. | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| TOTAL | 14 | 9 | 4 | 1 | 3 | 11 |

| GRUPO L RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|--------------|----------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. 1 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 2. 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 3. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. 3 | | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 5. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. 1 | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7. 1 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 8. 4 | | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 9. 1 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 12 | 4 | 4 | 4 | 1 | 12 |

| GRUPO M RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|--------------|----------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|---------------------------|-----------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. 2 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 2. 3 | | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 3. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 5. 2 | | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 6. 5 | | 0 | 3 | 2 | 0 | 5 |
| 7. 2 | | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 8. 2 | | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 9. 3 | | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 10. 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 21 | 7 | 7 | 7 | 3 | 18 |

| GRUPO N RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR INVASÃO | | | CLASSIFICAÇÃO POR ATIPIAS | |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|----------|------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | SUBMUCOSA | MUSCULAR | SEROSA/ PERITÔNIO/ METASTASE | BAIXO GRAU | ALTO GRAU |
| 1. 2 | | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 2. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. 3 | | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 4. 1 | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 5. 1 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. 1 | | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 9. 2 | | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 10. 3 | | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 11. 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12. 4 | | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 |
| TOTAL | 17 | 5 | 4 | 8 | 3 | 14 |

APÊNDICE F2 - NÚMERO DE CARCINOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO POR ATÍPIAS POR RATO/ GRUPO ANÁLISE ESTATÍSTICA

Grau de atípias do carcinoma nos grupos K e X. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,4564$) entre os grupos K e X em relação ao grau de atípias.

| Grupo | Grau de atípias | | Total |
|-------|-----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| X | 6 (35,29%) | 11 (64,71%) | 17 |
| Total | 9 | 22 | 31 |

Grau de atípias do 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 ao grau de atípias.

| Grupo | Grau de atípias | | Total |
|-------|-----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| III | 6 (23,08%) | 20 (76,92%) | 26 |
| Total | 9 | 31 | 40 |

Grau de atipias do carcinoma nos grupos X e III. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,4922$) entre os grupos X e III em relação ao grau de atipias.

| Grupo | Grau de diferenciação | | Total |
|-------|-----------------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| X | 6 (35,29%) | 11 (64,71%) | 17 |
| III | 6 (23,08%) | 20 (76,92%) | 26 |
| Total | 12 | 31 | 43 |

Grau de atipias do carcinoma nos grupos K, L, M e N. Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,8199$) entre os grupos K, L, M e N em relação ao grau de atipias.

| Grupo | Grau de atipias | | Total |
|-------|-----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| L | 1 (8,33%) | 11 (91,67%) | 12 |
| M | 3 (14,29%) | 18 (85,71%) | 21 |
| N | 3 (17,65%) | 14 (82,35%) | 17 |
| Total | 10 | 54 | 64 |

Grau de atipias do carcinoma nos grupos K e L. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,5983$) entre os grupos K e L em relação ao grau de atipias.

| Grupo | Grau de atipia | | Total |
|-------|----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| L | 1 (8,33%) | 11 (91,67%) | 12 |
| Total | 4 | 22 | 26 |

Grau de atipias do carcinoma nos grupos K e M. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 1,0000$) entre os grupos K e M em relação ao grau de atipia.

| Grupo | Grau de atipia | | Total |
|-------|----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| M | 3 (14,29%) | 18 (85,71%) | 21 |
| Total | 6 | 29 | 35 |

Grau de atipia do carcinoma nos grupos K e N. Dados analisados pelo teste exato de Fisher, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,6645$) entre os grupos K e N em relação ao grau atipia.

| Grupo | Grau de atipia | | Total |
|-------|----------------|-------------|-------|
| | Baixo | Alto | |
| K | 3 (21,43%) | 11 (70,57%) | 14 |
| N | 3 (17,65%) | 14 (82,35%) | 17 |
| Total | 6 | 25 | 31 |

APÊNDICE F3 - NÚMERO DE CARCINOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO E SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS POR RATO/GRUPO

| GRUPO I RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

| GRUPO IIA RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|----------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 |

| GRUPO IIB RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------------|----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |

| GRUPO III RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|----------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------------|-----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 4 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| 5 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 5 | 0 | 2 | 3 | 5 | 0 |
| 10 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 15 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 17 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 26 | 6 | 6 | 14 | 14 | 12 |

| GRUPO X RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|--------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1. | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 2. | 6 | 0 | 6 | 0 | 1 | 5 |
| 3. | 4 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2 |
| 4. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 5. | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| TOTAL | 17 | 1 | 11 | 5 | 4 | 13 |

| GRUPO K RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|--------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERADAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2. | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 |
| 3. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 4. | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9. | 4 | 1 | 0 | 3 | 1 | 3 |
| 10. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 11. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 12. | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| TOTAL | 14 | 2 | 8 | 4 | 4 | 10 |

| GRUPO L RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|-----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERATAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 2. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 3. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 5. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 7. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 8. | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| 9. | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| TOTAL | 12 | 0 | 8 | 4 | 1 | 11 |

| GRUPO M RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|--------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|---------------------------|-----------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERATAMENTE DIFERENCIADO | INDIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1. | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 2. | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 3. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4. | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5. | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 6. | 5 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 |
| 7. | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 8. | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 9. | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 10. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| TOTAL | 21 | 3 | 10 | 8 | 2 | 19 |

| GRUPO N RATO | NUMERO DE CARCINOMAS | CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO | | | SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICOS | |
|-----------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------|--------|
| | | BEM DIFERENCIADO | MODERATAMENTE DIFERENCIADO | IN DIFERENCIADO | CCT PURO | OUTROS |
| 1. | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 2. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3. | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 4. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 5. | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 6. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 9. | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| 10. | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 11. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12. | 4 | 0 | 4 | 0 | 2 | 2 |
| TOTAL | 17 | 0 | 10 | 7 | 6 | 11 |

APÊNDICE F4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE CARCINOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO POR DIFERENCIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

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 |

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 |

Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K , L, M e N: Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significante ($P = 0,06$) 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 |

Grau de diferenciação histopatológica nos grupos K e L: Dados analisados pelo teste do qui-quadrado, que não evidenciou diferença estatisticamente significante ($P = 0,39$) 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 |

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 |

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 |

APÊNDICE F5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE CARCINOMAS E SUA CLASSIFICAÇÃO POR SUBTIPOS HISTOPATOLÓGICO

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 | 04 (23,52) | 13 (76,47) | 17 |
| Total | 8 | 23 | 31 |

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 |

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 ao 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 |

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 |

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 |

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 |

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 |

APÊNDICE G - QUANTIFICAÇÃO MORFOMÉTRICA PELO SAMM POR TRIPLICATA POR BEXIGA POR GRUPO

| GRUPO/ RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|----------------|----------------|-----|-----|-----|---------------------|--------------------|-----------|--------|-------------|
| XX1 | P9020006 | 255 | 255 | 125 | 157399 | 15966 | 0,1014 | 10,14 | 6749 |
| XX1 | PA170020 | 255 | 255 | 116 | 117474 | 12198 | 0,1038 | 10,38 | 2691 |
| XX1 | P9020026 | 255 | 255 | 125 | 158030 | 14874 | 0,0941 | 09,41 | 6211 |
| XX2 | P9020038 | 255 | 255 | 144 | 196608 | 26078 | 0,1326 | 13,264 | 6289 |
| XX2 | P9020041 | 255 | 255 | 139 | 140981 | 15719 | 0,1115 | 11,156 | 3784 |
| XX2 | P9020043 | 255 | 255 | 149 | 164365 | 19843 | 0,1207 | 12,072 | 4773 |
| XX3 | P9020047 | 255 | 255 | 149 | 151358 | 18988 | 0,1254 | 12,54 | 5047 |
| XX3 | P9020055 | 255 | 255 | 149 | 153646 | 16960 | 0,1103 | 11,03 | 3871 |
| XX3 | P9020059 | 255 | 255 | 145 | 175137 | 26636 | 0,1520 | 15,20 | 7418 |
| XX4 | PB040032 | 255 | 255 | 156 | 139557 | 19084 | 0,1367 | 13,67 | 5527 |
| XX4 | PB040035 | 255 | 255 | 144 | 88520 | 7630 | 0,0861 | 08,61 | 2157 |
| XX4 | PB040029 | 255 | 255 | 128 | 77245 | 11692 | 0,1513 | 15,13 | 3695 |
| XX5 | P9020081 | 255 | 255 | 142 | 137932 | 13709 | 0,0993 | 09,93 | 3351 |
| XX5 | P9020074 | 255 | 255 | 139 | 149110 | 19671 | 0,1319 | 13,19 | 4770 |
| XX5 | P9020071 | 255 | 255 | 140 | 154967 | 18669 | 0,1204 | 12,04 | 4694 |

| GRUPO/ RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECCIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|----------------|----------------|-----|-----|-----|----------------------|--------------------|-----------|-------|-------------|
| III III4 | P1140006 | 255 | 255 | 159 | 069773 | 5196 | 0,0744 | 7,447 | 1549 |
| III III4 | P1140003 | 255 | 255 | 133 | 081201 | 5052 | 0,6221 | 6,221 | 1380 |
| III III4 | P1140016 | 255 | 255 | 133 | 102796 | 5491 | 0,0534 | 5,341 | 1431 |
| III III6 | P1140091 | 255 | 255 | 135 | 77800 | 5517 | 0,0709 | 7,09 | 1600 |
| III III6 | P1140098 | 255 | 255 | 127 | 55665 | 3533 | 0,0634 | 6,34 | 1048 |
| III III6 | P1140095 | 255 | 255 | 130 | 73311 | 5117 | 0,0697 | 6,97 | 1377 |
| III III8 | P1140042 | 255 | 255 | 145 | 094265 | 6035 | 0,0640 | 6,40 | 1569 |
| III III8 | P1140028 | 255 | 255 | 142 | 112413 | 5374 | 0,0478 | 4,78 | 1392 |
| III III8 | P1140050 | 255 | 255 | 147 | 094793 | 5637 | 0,0594 | 5,94 | 1439 |
| III III9 | P1140174 | 255 | 255 | 125 | 72343 | 4584 | 0,0633 | 6,33 | 1381 |
| III III9 | P1140145 | 255 | 255 | 125 | 90141 | 5922 | 0,0656 | 6,56 | 1715 |
| III III9 | P1140147 | 255 | 255 | 127 | 92903 | 5588 | 0,0614 | 6,01 | 1672 |
| III III11 | P1140107 | 255 | 255 | 133 | 097207 | 7617 | 0,0783 | 7,83 | 2261 |
| III III11 | P1140119 | 255 | 255 | 145 | 122620 | 9682 | 0,0789 | 7,89 | 2903 |
| III III11 | P1140122 | 255 | 255 | 132 | 092475 | 5317 | 0,0574 | 5,74 | 1737 |

| GRUPO/ RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECCIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|----------------|----------------|-----|-----|-----|----------------------|--------------------|-----------|--------|-------------|
| KK2 | 9300078 | 255 | 255 | 135 | 111449 | 9175 | 0,0823 | 08,23 | 1753 |
| KK2 | 9300080 | 255 | 255 | 140 | 093977 | 8709 | 0,0926 | 09,26 | 2191 |
| KK2 | 9300081 | 255 | 255 | 149 | 106587 | 7935 | 0,0744 | 07,44 | 1926 |
| KK4 | 9300102 | 255 | 255 | 132 | 142949 | 11488 | 0,0803 | 0,803 | 3168 |
| KK4 | P9300110 | 255 | 255 | 140 | 115520 | 13723 | 0,1187 | 11,87 | 2870 |
| KK4 | PA170064 | 255 | 255 | 133 | 097139 | 07105 | 0,0731 | 07,31 | 2374 |
| KK5 | PC160073 | 255 | 255 | 145 | 48863 | 04067 | 0,0832 | 08,32 | 1036 |
| KK5 | PC160060 | 255 | 255 | 133 | 43193 | 02633 | 0,0610 | 06,10 | 0622 |
| KK5 | PC100066 | 255 | 255 | 135 | 61829 | 04102 | 0,0663 | 06,10 | 0976 |
| KK10 | PC160053 | 255 | 255 | 142 | 097216 | 06818 | 0,0701 | 07,01 | 1733 |
| KK10 | P9090071 | 255 | 255 | 135 | 128520 | 12522 | 0,0974 | 09,74 | 3033 |
| KK10 | P9090077 | 255 | 255 | 145 | 080122 | 06555 | 0,0818 | 08,18 | 1629 |
| KK11 | P930089 | 255 | 255 | 118 | 094068 | 08283 | 0,0880 | 08,80 | 2584 |
| KK11 | P960081 | 255 | 255 | 125 | 141438 | 14289 | 0,1010 | 10,10 | 2584 |
| KK11 | PC160086 | 255 | 255 | 106 | 069004 | 07454 | 0,1080 | 10,80 | 2520 |
| KK12 | PB040178 | 255 | 255 | 103 | 091478 | 10664 | 0,1100 | 11,00 | 3201 |
| KK12 | PB040166 | 255 | 255 | 089 | 114290 | 14099 | 0,1233 | 12331 | 4293 |
| KK12 | PA170040 | 255 | 255 | 111 | 078836 | 06624 | 0,0840 | 08,402 | 1762 |

| GRUPO /RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECCIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|-------------|-------------|-----|-----|-----|-------------------|-----------------|-----------|-------|-------------|
| LL1 | P9020085 | 255 | 255 | 130 | 134372 | 12820 | 0,0954 | 09,54 | 3358 |
| LL1 | P9020086 | 255 | 255 | 139 | 118272 | 12512 | 0,1057 | 10,57 | 3270 |
| LL1 | P9020104 | 255 | 255 | 128 | 149760 | 13286 | 0,0879 | 08,87 | 3052 |
| LL2 | PA100112 | 255 | 255 | 127 | 091108 | 07180 | 0,0788 | 07,88 | 1408 |
| LL2 | P9300010 | 255 | 255 | 120 | 143811 | 12799 | 0,0889 | 08,89 | 2668 |
| LL2 | P0193009 | 255 | 255 | 125 | 130895 | 15843 | 0,1210 | 12,10 | 3448 |
| LL9 | P9020105 | 255 | 255 | 144 | 138042 | 09935 | 0,0719 | 07,19 | 2026 |
| LL9 | P9020107 | 255 | 255 | 151 | 151888 | 14344 | 0,0944 | 09,44 | 3376 |
| LL9 | P9020113 | 255 | 255 | 125 | 102832 | 08533 | 0,0821 | 08,21 | 1860 |
| LL10 | P9020119 | 255 | 255 | 142 | 110355 | 07505 | 0,0680 | 06,80 | 1618 |
| LL10 | P9020120 | 255 | 255 | 130 | 140281 | 10984 | 0,0783 | 07,83 | 2413 |
| LL10 | P9020129 | 255 | 255 | 125 | 126429 | 12663 | 0,1001 | 10,01 | 2994 |
| LL11 | P9020140 | 255 | 255 | 132 | 152920 | 07226 | 0,0472 | 04,72 | 1505 |
| LL11 | P9020139 | 255 | 255 | 142 | 149288 | 12360 | 0,0827 | 08,27 | 2909 |
| LL11 | P9020137 | 255 | 255 | 139 | 144877 | 09652 | 0,0666 | 06,66 | 2024 |

| GRUPO/RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECCIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|------------|----------------|-----|-----|-----|----------------------|--------------------|-----------|-------|-------------|
| MM2 | P9090013 | 255 | 255 | 139 | 164964 | 10255 | 0,0621 | 06,21 | 2622 |
| MM2 | P9090032 | 255 | 255 | 147 | 160890 | 15522 | 0,0965 | 09,65 | 3512 |
| MM2 | P9090010 | 255 | 255 | 152 | 151746 | 07471 | 0,0492 | 04,92 | 2211 |
| MM5 | P9090045 | 255 | 255 | 140 | 108160 | 08728 | 0,0806 | 08,06 | 2277 |
| MM5 | P9090039 | 255 | 255 | 144 | 123428 | 01818 | 0,0957 | 09,57 | 2349 |
| MM5 | P9090041 | 255 | 255 | 140 | 109067 | 08505 | 0,0779 | 07,79 | 2661 |
| MM7 | PA100156 | 255 | 255 | 139 | 123263 | 10319 | 0,0812 | 08,12 | 2112 |
| MM7 | PA100161 | 255 | 255 | 139 | 090506 | 09617 | 0,1062 | 10,62 | 2294 |
| MM7 | PA100148 | 255 | 255 | 130 | 113536 | 07024 | 0,0618 | 06,18 | 2053 |
| MM8 | PA170045 | 255 | 255 | 122 | 121070 | 09132 | 0,0754 | 07,54 | 2021 |
| MM8 | PA100173 | 255 | 255 | 132 | 121734 | 08511 | 0,0699 | 06,99 | 1725 |
| MM8 | PA100166 | 255 | 255 | 133 | 115391 | 06260 | 0,0542 | 05,42 | 1118 |
| MM11 | P9090013 | 255 | 255 | 153 | 154890 | 09255 | 0,0597 | 05,97 | 2293 |
| MM11 | P7170051 | 255 | 255 | 125 | 096962 | 09495 | 0,0983 | 09,83 | 2757 |
| MM11 | P9090035 | 255 | 255 | 139 | 151498 | 06873 | 0,0453 | 04,53 | 1886 |

| GRUPO/RATO | FOTO NUMERO | TR | TG | TB | ÁREA SELECCIONADA | AREA SEGMENTADA | DENSIDADE | % | COMPRIMENTO |
|------------|----------------|-----|-----|-----|----------------------|--------------------|-----------|-------|-------------|
| NN1 | P9300037 | 255 | 255 | 133 | 108599 | 7946 | 0,0731 | 07,31 | 2034 |
| NN1 | P9300034 | 255 | 255 | 128 | 113318 | 6845 | 0,0604 | 06,04 | 2244 |
| NN1 | P9230126 | 255 | 255 | 125 | 106212 | 8963 | 0,0840 | 08,40 | 2617 |
| NN3 | P9230140 | 255 | 255 | 157 | 101292 | 6799 | 0,0671 | 06,71 | 1701 |
| NN3 | P9090123 | 255 | 255 | 125 | 126779 | 5604 | 0,0442 | 04,42 | 1436 |
| NN3 | P9230132 | 255 | 255 | 125 | 121411 | 7376 | 0,0607 | 06,07 | 2179 |
| NN6 | P9300021 | 255 | 255 | 130 | 103394 | 06269 | 0,0606 | 06,06 | 1192 |
| NN6 | P9300017 | 255 | 255 | 135 | 137306 | 12986 | 0,0945 | 09,45 | 2856 |
| NN6 | P9090126 | 255 | 255 | 139 | 113305 | 05907 | 0,0521 | 05,21 | 1216 |
| NN9 | P9230124 | 255 | 255 | 133 | 093776 | 07601 | 0,0761 | 07,61 | 1439 |
| NN9 | P9230113 | 255 | 255 | 149 | 119192 | 07394 | 0,0620 | 06,20 | 1529 |
| NN9 | P9020134 | 255 | 255 | 149 | 137369 | 08320 | 0,0222 | 02,22 | 1415 |
| NN10 | P9300064 | 255 | 255 | 129 | 073823 | 5111 | 0,0692 | 06,92 | 1213 |
| NN10 | P9300062 | 255 | 255 | 139 | 109883 | 6255 | 0,0569 | 05,69 | 1497 |
| NN10 | P9300045 | 255 | 255 | 130 | 078426 | 4419 | 0,0563 | 05,63 | 1119 |

APÊNDICE H - PUBLICAÇÕES

APÊNDICE H-1- PUBLICAÇÃO EM ANAIS DE REVISTA LOCAL ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO – UNIVERSIDADE DE FORTALEZA.

PRODUTO DE PRÓPOLIS VERDE SOLÚVEL EM ÁGUA (WSDP):

UM MODELO PARA USO FARMACOLÓGICO COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Autores:

Conceição Aparecida Dornelas¹ (PG), Irineu Lima Albuquerque² (PG), Alúcio Marques da Fonseca (PG)², Luciana Luca Machado² (PG), Leonardo Alcântara² (IC), Thiago Alves Dias³ (IC),

Professores Orientadores: Manoel Odorico de Moraes^{3,1}, (PQ) e Telma L. G. Lemos² (PQ)

1. Pós-Graduação em Cirurgia – UFC, 2. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica - UFC; 3. Departamento de Farmacologia -UFC

Resumo

A própolis verde é um tipo de própolis produzido por abelhas na região sudeste do Brasil, recebe este nome devido a sua cor. Suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, antioxidante e antineoplásicas, vêm sendo descritas por muitos pesquisadores. O desafio para as investigações da ação farmacológica da própolis *in vivo* é a sua insolubilidade na água. O presente trabalho propõe um modelo de extração de própolis solúvel em água, baseado em estudos do Professor Nicolov do WSDP (própolis solúvel em água), mantendo suas propriedades antioxidantes, visando seu uso farmacológico experimental. A própolis bruta foi obtida do estado de Minas Gerais, submetida à extração em etanol, éter de petróleo, éter etílico e acrescida de l-lisina a 8%. O extrato própolis/lisina foi submetido a liofilização com avaliação do potencial antioxidante *in vitro* pelo método do seqüestro de radical 1,1- difenil-2 picril-hidrazil. Como resultado obteve-se um pó com atividade antioxidante semelhantes a vitamina C e Vitamina E sintética hidrossolúvel, adequado para estudo experimental farmacológico *in vivo*.

Introdução:

A própolis é um material composto de substâncias resinosas de consistência viscosa de odor agradável, de cor castanha a verde e de sabor amargo, recolhido pelas abelhas de partes de vegetais (caules, folhas e flores) que a transportam até a colméia onde adicionam e modificam a sua composição através de secreções salivares. Seu emprego remonta aos assírios, gregos romanos, incas e egípcios. Hipócrates a utilizou como cicatrizante.

As atividades: antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antiviral, antioxidante e anticancerígena,^{1,2,3,7} têm sido os alvos das pesquisas. A própolis da região sudeste do Brasil, conhecida como própolis verde, devido a sua cor, relacionada à vegetação que circunda é a que tem sido mais estudada. Considerando a imensa diversidade de flora de nosso país é grande a expectativa com relação ao potencial farmacológico que abriga essa mágica resina da natureza. Infelizmente não são laboratórios brasileiros os mais interessados nas pesquisas com a própolis. Os japoneses (maiores importadores de própolis do Brasil) não só a tem estudado, mas patenteado e sintetizado seus componentes químicos para avanço de suas pesquisas. O maior desafio para o estudo da atividade farmacológica in vivo da própolis é conseguir um extrato da própolis livre de álcool uma vez que a própolis é insolúvel em água. Foi o contato com pesquisador professor croata Nada Orsolich⁴, que nos proporcionou o conhecimento do trabalho desenvolvido pelo Dr. Nicolov⁵ e seus colaboradores, patenteado nos anos 80. Trata-se do *Water Soluble Derivative of Própolis (WSDP)*, extrato de própolis solúvel em água.

Objetivos:

Realizar a extração da própolis verde solúvel em água, com atividade antioxidante, para uso farmacológico em trabalho experimental em animais.

Materiais e métodos:

A coleta da própolis verde foi realizada na cidade de Passa Quatro, Minas Gerais, nos meses de setembro e outubro. O método de extração seguido foi o de de Nicolov *et al.*⁵ com pequenas modificações. A própolis foi fragmentada e colocada em frasco contendo álcool etílico (figs. I) e macerada por 15 dias (figs. II). O extrato alcoólico (EE Prop) foi levado à concentração em “banho maria” (fig. III), e em seguida extraído por partição líquido-líquida (figs. IV) com éter de petróleo e éter etílico. O extrato de éter etílico foi levado a concentração por evaporação. A 1-lisina em solução aquosa a 8% foi aquecida em “banho maria” à uma temperatura entre 51 e 60° e sob agitação constante foi adicionado o extrato

concentrado de éter etílico por 30 minutos (figs. V), resfriado à temperatura ambiente e levado a freezer por 24 horas, filtrado e liofilizado* (Figs. VI). A WDSP liofilizada foi avaliada quanto ao potencial antioxidante *in vitro* seguindo a metodologia de Hegazi,⁹.



Figura I a VI – Extração da própolis WSDP

Resultados e Discussão:

Obteve-se um pó amarelo claro com odor característico da própolis e sabor levemente salgado.

Ainda não se tem uma padronização da técnica extração da própolis isso se deve insolubilidade da propolis em água bem como os múltiplos e variados constituintes da própolis. A WDSP vem sendo estudada principalmente na Bulgária, trazendo contribuições para o conhecimento das suas atividade antineoplásica,, antiinflamatórias e antibacteriana, em animais. Quando questionado sobre o porquê do acréscimo de lisina, o professor Orsolice respondeu: “- A lisina aumenta a solubilização da própolis em água. Em geral a fração da própolis solúvel em água é muito menor que a solúvel em álcool e com a adição de aminoácidos a solubilidade aumenta dramaticamente. A exata razão não esta ainda bem clara, mas alguns tipos de complexos podem se formar. De qualquer forma a própolis em solução aquosa pura perde suas propriedades antibacterianas”. Durante todo o procedimento de extração do WSDP o objetivo final é reunir no extrato final flavonoides e ácidos fenólicos (substancias antioxidantes). Algumas substâncias da própolis verde já foram isoladas e devido ao seu potencial terapêutico, foram patenteadas, e sintetizadas, entre elas o artepillin C, com atividade antineoplásica⁶, o éster feniletil do ácido cafeico, que é descrito como um potente inibidor específico da ativação do fator de transcrição nuclear NF Kappa B^{7,8}. Muitas outras substâncias de interesse farmacológico tem sido isoladas e vem sendo estudas.

O produto liofilizado final submetido a ensaio antioxidante usando o método do sequestro de radical DPPH (1,1-difenil-2 picril-hidrazil)⁹. Na concentração de 1000 ppm, a própolis alcançou valores próximos ao da atividade antioxidante dos controles vitamina C e Trolox , um antioxidante sintético similar a vitamina E (vide tabela 1):

Tabela 1: Atividade antioxidante do extrato liofilizado comparado com o padrão.

| Tratamento | Concentração (ppm) | | | | | | |
|------------|--------------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|------------------------|
| | 1000 | | 250 | | 62.5 | | IC ₅₀ (ppm) |
| | Atividade | % | Atividade | % | Atividade | % | |
| 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-2 (b) | 0.0170 | 95.06 | 0.0200 | 94.19 | 0.1180 | 65.70 | 28.62 |

Esta atividade antioxidante é de muito interesse para as pesquisas que envolvem ações antiinflamatórias, antineoplásicas estando diretamente relacionadas com o objetivo proposto.

Conclusão:

O produto da própolis verde solúvel em água (WSDP), com atividade antioxidante demonstrada *in vitro* foi alcançado estando pronto para uso farmacológico em pesquisa em animais.

Agradecimentos:

*As técnicas do LOE (laboratório de Oncologia Experimental- UFC) Silvana e Luciana pelo trabalho de liofilização.

Referências Bibliográficas:

- 1 Mitamura T, Matsuno T, Sakamoto S, et al. Effects of a new clerodane dipertnoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. *Antic. Res.*1996; 2669-2672.
- 2 - Langoni H, Domingues PF, Furani SRC, Chande CG, Neves IR Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. *Arq bras Méd Vet Zootec* 1996; 48(2) :227-229.
- 3- Huleihel M, Isanu V Anti-herpes simples vírus effect of na Aqueos Extract of própolis. *IMAJ* 2002 4:923-927.
- 4 Orsđlić N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharmacol. Bull.* 2005; 28(10):1928-1933.
- 5- Nicolov, N, Marekov, N Bankova, V, Popov S Ignatova, R Vladmirova, I 1987. Method for the preparation of water – soluble derivative of propolis. *Bulgarian journal of pathology applied* 79903/2805 .
- 6- Kimoto,T - Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K et al. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Virchows Arch* 2001; 438:259-270.
- 7- Natarajan K Singh S Burket JK. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF Kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(17):9090-9095.
- 8-Paulino N. Mecanismo Farmacológico de ação da própolis no organismo. Disponível em:<<
http://www.ctato.net/prodapys/br/pdp_pesq_54.htm>>. Acesso em: 28 ago 2006.
- 9-Hegazi AG, Abd El Hady FK. Egyptian propolis: 3. antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands, *Z Naturforsch*, 2002;57c:395-402.

APÊNDICE H 2 - PUBLICAÇÃO PARALELA

APÊNDICE H 3- PUBLICAÇÃO INTERNACIONAL

APÊNDICE H 4 – FASE DE ENVIO PARA PUBLICAÇÃO

Inhibition of angiogenesis by Water-Soluble Derivative green Propolis and the angiogenic effect of *L*-lysine on bladder cancer in rats

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS^{1*}, FRANCISCO VAGNALDO FECHINE-JAMACARU², IRINEU LIMA ALBUQUERQUE³, MÁRIO H. G. FARIA², MARKÊNIA KELIA. SANTOS ALVES⁴, HEMERSON YURI FERREIRA MAGALHÃES², THIAGO ALVES DIAS², ADJAIR JAIRO SILVA DE SOUZA², PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA⁴, TELMA LEDA GOMES DE LEMOS³, JOSÉ DANIEL VIEIRA DE CASTRO⁵, SILVIA HELENA RABENHORST⁴, MARIA ELIZABETE AMARAL DE MORAES², MANOEL ODORICO DE MORAES^{1,2}

¹Postgraduation in Surgery. Department of Surgery. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

²Department of Physiology and Pharmacology. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

³Department of Organic and Inorganic Chemistry. UFC Laboratory of Biocatalysis and Natural Products. Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴Department of Pathology and Forensic Medicine. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁵Department of Radiology. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

Abstract. The use of propolis for medicinal purposes dates from Antiquity. Today it continues to be used in folk medicine to treat infections and neoplasias worldwide. The Aim of the study is to observe the effects of intragastric administration of green propolis WSDP (Water-Soluble Derivative of Propolis) and *L*-lysine on the angiogenesis of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer in rats. Rats with BBN-induced bladder cancer received propolis (Group 5) or *L*-lysine (Group 6) at 150 mg/kg/day for 40 weeks. From the 32nd to the 40 th week, Groups 1, 2, 3 and 4 received, respectively, water, *L*-lysine (300 mg/kg/day), celecoxib (30 mg/kg/day) and propolis (300 mg/kg/day). Microvascular density was determined from the number of CD31-immunopositive cells and vessels in tumor tissues. The microvascular density of hot spots in bladder carcinomas was lower ($p<0.01$) in rats receiving propolis than in controls receiving carcinogen only. On the other hand, the microvascular density of tumors in rats receiving carcinogen and *L*-lysine for 40 weeks since the beginning of carcinogenesis was significantly higher ($p<0.01$) than in the corresponding controls. The results suggest that green propolis (WSDP) inhibits angiogenesis in BBN-induced rat bladder cancer, while *L*-lysine stimulates angiogenesis if initiated concurrently with BBN and administered for 40 weeks.

Key words: Propolis; angiogenesis; antiangiogenesis; bladder cancer; *L*-lysine.

* Correspondence to: Conceição Aparecida Dornelas: UFC-UNIFAC-CPDM - UFC - Departamento de Fisiologia e Farmacologia- Rua Coronel Nunes de Mello, 1127 CEP – 60430 270 Fortaleza – CE Brasil. Fax Tel.: 55 085 33668201 E-mail adress - eusoucondor@yahoo.com.br

APÊNDICE H 5– FASE DE ENVIO PARA PUBLICAÇÃO

Chemopreventive effect of water-soluble derivative of green propolis versus promoting effect of *L*-lysine in BBN-induced rat bladder cancer

CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS^{1†}, FRANCISCO VAGNALDO FECHINE-JAMACARU², IRINEU LIMA ALBUQUERQUE³, HEMERSON YURI FERREIRA MAGALHÃES², LEONARDO ALCÂNTARA³ ALVES, THIAGO ALVES DIAS², ADJAIR JAIRO SILVA DE SOUZA², SILVIO MELO TORRES¹, PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA⁴, TELMA LEDA GOMES DE LEMOS³, JOSÉ DANIEL VIEIRA DE CASTRO⁵, MARIA ELIZABETE AMARAL DE MORAES², MANOEL ODORICO DE MORAES^{1,2}

¹Postgraduation in Surgery. Department of Surgery. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

²Department of Physiology and Pharmacology. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

³Department of Organic and Inorganic Chemistry. UFC Laboratory of Biocatalysis and Natural Products. Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴Department of Pathology and Forensic Medicine. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁵Department of Radiology. UFC Medical School. Fortaleza, Ceará, Brazil.

Abstract: The study evaluated the effect of chronic, intragastric (i.g.) or subcutaneous (s.c.) administration of *L*-lysine-extracted water-soluble derivative of green propolis and of *L*-lysine alone at 150 mg/kg/day for 40 weeks upon BBN-induced rat bladder carcinogenesis. Seventy-seven rats were assigned to nine study groups: Group I received propolis i.g. 30 days prior to BBN; Groups IIA and III received propolis i.g. and s.c., respectively, concurrently with BBN; Group X received *L*-lysine i.g.; and Groups IIB and K received water s.c. and orally. Among the animals not submitted to carcinogenesis induction, Group XI received propolis i.g.; Group XII received *L*-lysine i.g.; and Group XIII received water i.g. The animals were euthanized after 40 weeks with an overdose of anesthetics. Following verification of normality, the data were analyzed and results were expressed as absolute, relative and median frequency. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The carcinoma incidence in Group I ($p = 0.0427$; Fisher) was smaller and the carcinoma multiplicity in Group X ($p = 0.0267$; Mann-Whitney) was greater than in Group K (BBN and water). All (100%) animals treated with *L*-lysine (Group X) developed carcinomas. Carcinomas were also more invasive in Group X than in controls (Group K). Group XII (*L*-lysine only) presented no bladder lesions. The results suggest that green propolis (WSDP) provides chemoprevention against rat bladder carcinogenesis, if administered i.g. 30 days prior to carcinogenesis and then chronically, and that *L*-lysine causes promotion of carcinogenesis (after initiation) if administered i.g. and chronically.

[†] Correspondence to: Conceição Aparecida Dornelas: UFC-UNIFAC-CPDM - UFC - Departamento de Fisiologia e Farmacologia- Rua Coronel Nunes de Mello, 1127 CEP – 60430 270 Fortaleza – CE Brasil. Fax Tel.: 55 085 33668201 E-mail adress - eusoucondor@yahoo.com.br

APÊNDICE I

Ensaio do Cometa - Índice de Dano em linfócitos em sangue de aorta.

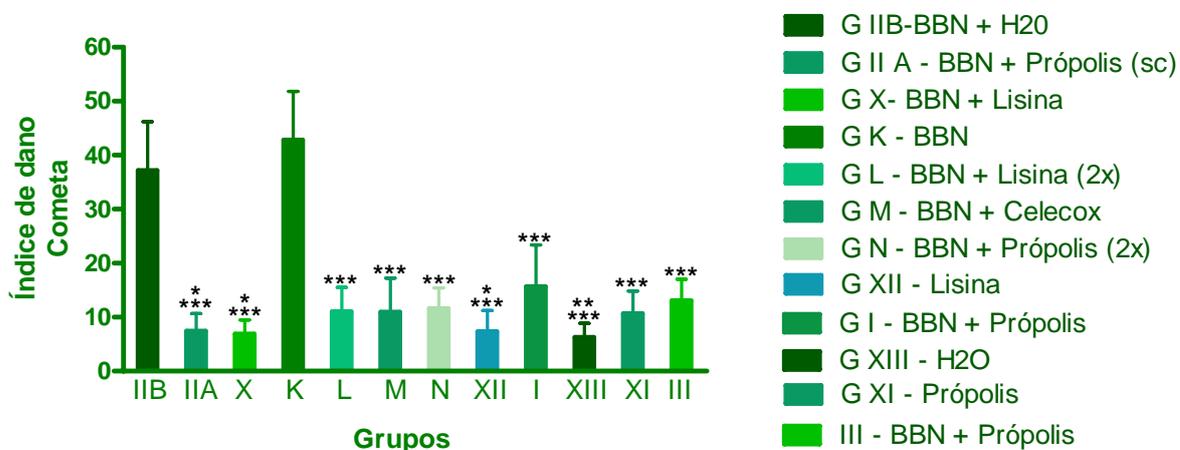


FIGURA 1 – Ensaio do Cometa realizado em linfócitos do sangue para avaliação de dano no DNA. Quantificação de micronúcleos e comparação entre os grupos. Dados expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, *** $P < 0,001$ em relação aos grupos IIB e K; ** $P < 0,01$ em relação ao grupo I; * $P < 0,05$ em relação ao grupo I.

TABELA 1 - Índice de Dano: é dado pela fórmula $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n é o número de cometas de respectivas classes

| Classes | Dano no DNA | % de Dano |
|---------|-------------|-----------|
| 0 | Sem danos | <5% |
| 1 | Baixo nível | 5-20% |
| 2 | Médio nível | 20-40% |
| 3 | Alto nível | 40-95% |
| 4 | máximo | >95% |

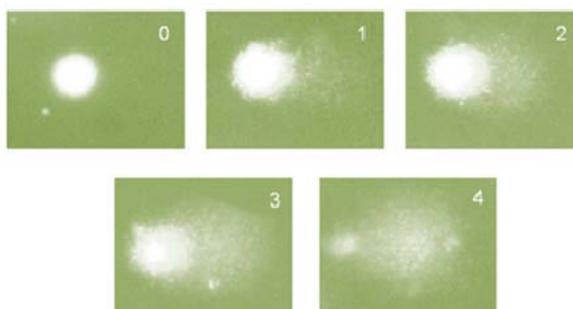


FIGURA 2 - Classes para cálculo do Índice de Dano do Ensaio Cometa (0, 1, 2, 3 e 4):

APÊNDICE J

Ensaio do Micronúcleo – Micronúcleo em eritroblastos de medula óssea de fêmur

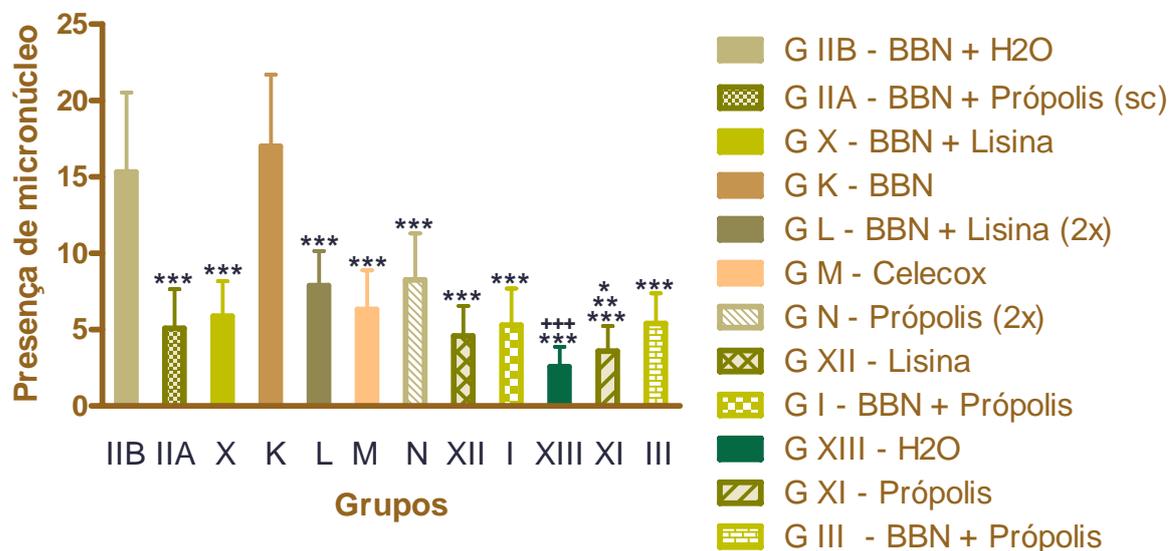


FIGURA 2 – Ensaio do Micronúcleo avaliado em esfregaço de aspirado de medula óssea de fêmur. Quantificação de micronúcleos e comparação entre os grupos. Dados expressos como média e desvio padrão. Comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey.

*** $P < 0,001$ comparado aos grupos IIB e K;

+++ $P < 0,001$ comparado aos grupos L e N;

** $P < 0,01$ comparado ao grupo N;

* $P < 0,05$ comparado ao grupo L.

APÊNDICE K

Ensaio com sarcoma 180 e tumor de Walker

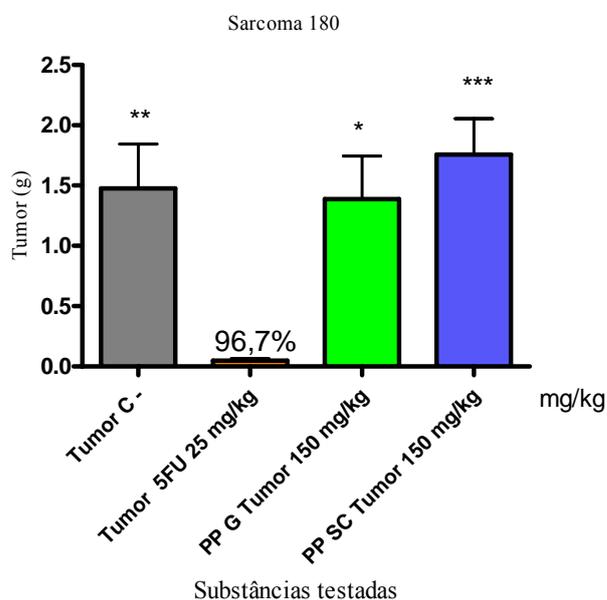


Figura 1 - Massa tumoral (úmida) de camundongos *Mus musculus* (Swiss) transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância. O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Própolis 150 mg/kg/dia administrado por via oral (gavagem PP G) e por via subcutânea (SC). $P < 0,05$ comparando com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

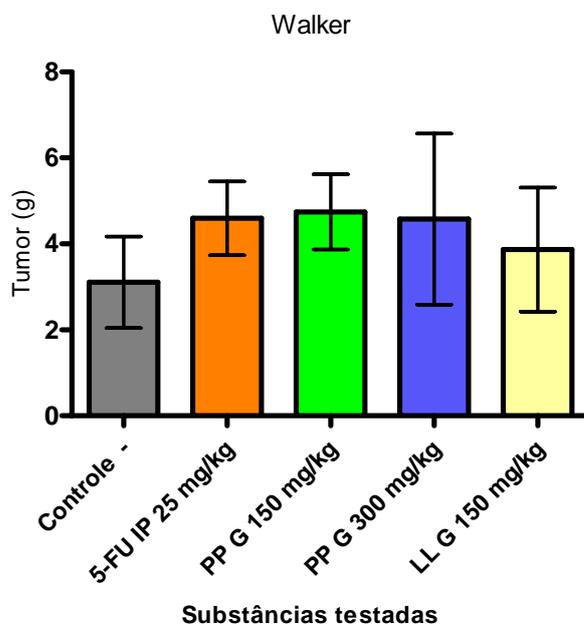


Figura 2 - Massa tumoral (úmida) de ratos (Wistar) transplantados com Carcinosarcoma de Walker e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância. O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Própolis 150 mg/kg/dia administrado por via subcutânea (SC), por via oral (gavagem - PPG), e L-lisina * $P < 0,05$ comparando com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 01 – Efeito sobre o peso relativo de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e ratos Wistar, transplantados com tumor de Walker. Os camundongos foram tratados com Própolis na dose de 150 mg/kg/dia por via oral (gavagem – PP G) e subcutânea (PP SC), em um período de 7 dias. Enquanto os ratos Wistar foram tratados com Própolis nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia por via oral (gavagem – PP G) e L-lisina 150mg/kg/dia em um período de 7dias. O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) foi utilizado como controle positivo na dose de 25 mg/kg/dia. Os valores correspondem à média ± E.P.M.

| | Tratamento | Dose (mg/kg/dia) | Peso final dos animais (g) | Fígado | Rins | Baço |
|-------------|------------|------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | | (g)/100g de massa corpórea | | |
| Sarcoma 180 | Controle | - | 37,71 ± 3,14 | 4,71 ± 0,75 | 1,53 ± 0,34 | 0,53 ± 0,14 |
| | 5-FU | 25 | 28,43 ± 2,69 | 4,15 ± 0,30 | 1,45 ± 0,05 | 0,16 ± 0,02 ^a |
| | PP G | 150 | 39,43 ± 2,50 | 3,66 ± 0,49 ^a | 1,24 ± 0,20 | 0,49 ± 0,12 |
| | PP SC | 150 | 40,71 ± 3,59 | 4,82 ± 0,37 | 1,33 ± 0,15 | 0,41 ± 0,05 |
| Walker | Controle | - | 220,6 ± 11,56 | 3,72 ± 0,52 | 0,76 ± 0,15 | 0,48 ± 0,09 |
| | 5-FU | 25 | 195,1 ± 10,49 | 3,77 ± 0,68 | 0,83 ± 0,11 | 0,51 ± 0,10 |
| | LL G | 150 | 214,4 ± 9,47 | 3,81 ± 0,27 | 1,01 ± 0,09 ^a | 0,54 ± 0,14 ^a |
| | PP G | 150 | 220,0 ± 11,34 | 3,81 ± 0,52 | 0,77 ± 0,15 | 0,43 ± 0,08 |
| | PP G | 300 | 222,8 ± 10,17 | 4,07 ± 0,85 | 0,69 ± 0,09 | 0,72 ± 0,06 |

^a (p < 0,01) comparado ao controle, analisado por ANOVA, seguido por Dunnett's.

APÊNDICE L

Angiogênese perivascular: tumor de Walker

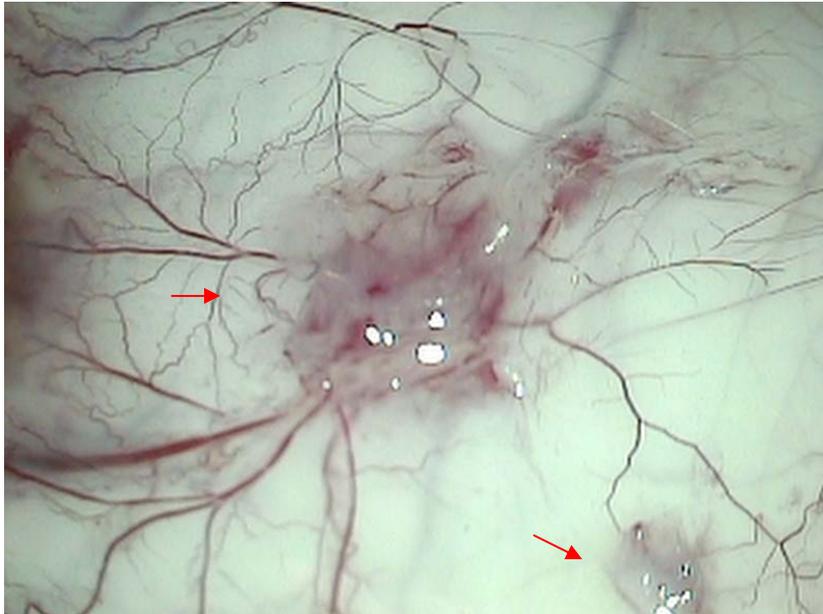


FIGURA 1- Escalpe de dorso de rato evertido. Tumor de Walker 7º dia pós inoculação em subcutâneo (dois implantes – setas) - Nota-se angiogênese em vários níveis em direção ao tumor nos quatro quadrantes.

Aquisição e processamento das imagens

Imagens digitais representativas da neovascularização peritumoral foram capturadas de forma padronizada nos quatro quadrantes da periferia do tumor: superior, inferior, direito e esquerdo. Para tanto, utilizou-se um microscópio cirúrgico (D. F. Vasconcellos M90, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) com uma câmera de vídeo analógica (Hitachi VCC-151, Japan) acoplada, que, por sua vez, era conectada a um microcomputador equipado com um sistema de captura de vídeo (PixelView® PV-TV304P, Prolink Microsystems Corp., Taiwan). O eixo do microscópio foi fixado a 70° com o plano horizontal para diminuir a ocorrência de reflexos luminosos no tecido estudado. As imagens foram capturadas com uma magnificação de 16 vezes, sendo acionado o filtro verde (*red free*) do microscópio com o intuito de aumentar o contraste entre os vasos sanguíneos e as demais estruturas. Para padronizar o enquadramento da região a ser fotografada, demarcaram-se pontos no monitor, de maneira que a borda do tumor foi posicionada no centro da porção inferior da imagem, a aproximadamente 2 mm da sua margem. As imagens digitais coloridas relativas aos quatro

quadrantes foram então capturadas e armazenadas no formato Windows[®] Bitmap (BMP), com as dimensões de 320 x 240 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

A resposta angiogênica foi mensurada pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese (SQAN), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). Tal *software* é capaz de reconhecer e segmentar automaticamente as estruturas vasculares, separando-as dos demais componentes da imagem. Todavia, uma segmentação interativa é também disponibilizada, possibilitando, assim, a definição de novos parâmetros de segmentação, caso o pesquisador julgue como inadequado o resultado do procedimento automático. Concluído o processo de segmentação, o sistema determina os seguintes parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos. A resposta neovascular foi então quantificada nas imagens relativas aos quatro quadrantes da periferia do tumor. Assim, o valor final de um dado parâmetro correspondeu ao somatório das medidas realizadas em cada um dos quadrantes.

RESULTADOS

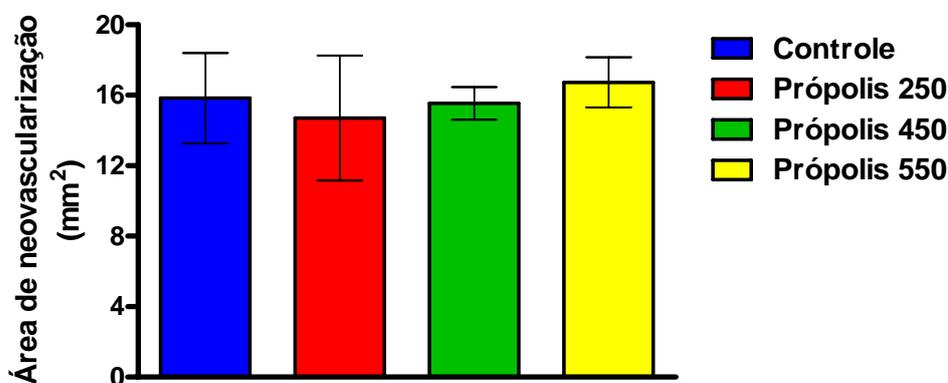


FIGURA 2 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos controle, própolis 250, própolis 450 e própolis 550, conforme a variável área de neovascularização. Os dados, expressos em mm², correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em seis animais de cada grupo. Comparações entre os quatro grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da 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. ANOVA: $F = 0,7586$; $P = 0,5304$.

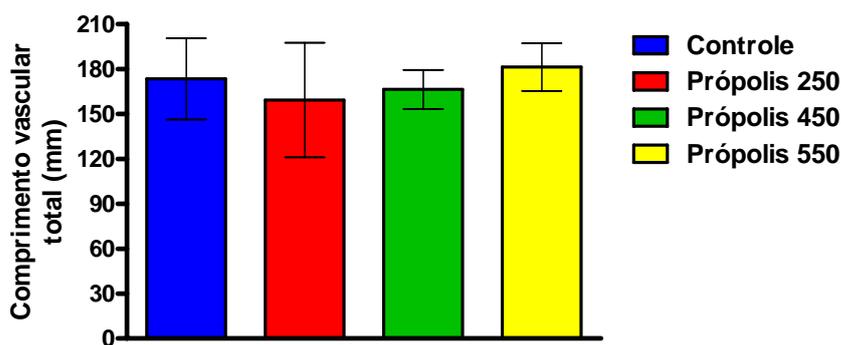


FIGURA 3 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos controle, própolis 250, própolis 450 e própolis 550, conforme o parâmetro comprimento vascular total. Os dados, expressos em mm, correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em seis animais de cada grupo. Comparações entre os quatro grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da 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. ANOVA: $F = 0,8146$; $P = 0,5008$.

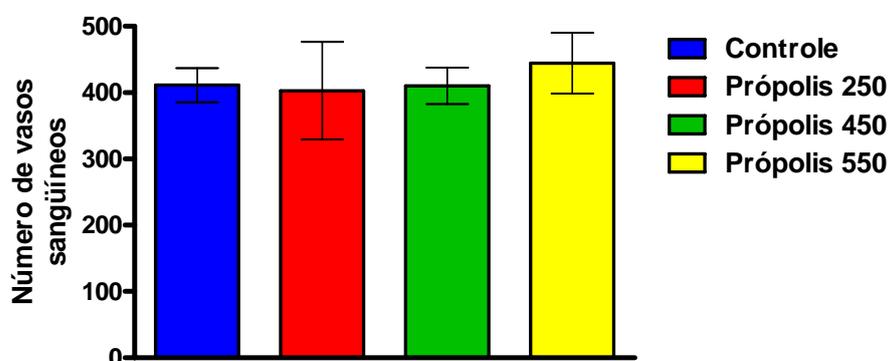


FIGURA 4 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos controle, própolis 250, própolis 450 e própolis 550, conforme o parâmetro número de vasos sanguíneos. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em seis animais de cada grupo. Comparações entre os quatro grupos de tratamento foram feitas mediante o uso da 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. ANOVA: $F = 0,9226$; $P = 0,4479$.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEPA- UFC



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 angiogênese 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

**ANEXO B – LAUDO DE ANÁLISE DO EXTRATO DA PRÓPOLIS
DE PASSA QUATRO MG**



UNITAU - DEPTO. DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CEA
Rua Quatro de Março, 432 - Centro - CEP: 12020-270 - Taubaté - SP
Fone: (12) 225 4116 / e-mail: cca@alpha.prrpgg.unitau.br

LAUDO DE ANÁLISE

Análise físico-química do extrato de própolis nº 55
Normas do MAA, SDA, DÍPOA nº 574, 8/12/1998.
Portaria nº 25, 31/ 07/2000.

Requisitante: FRANCISCO JOSÉ NETO

Endereço: AV. SALGADO SCARPA Nº 413

Bairro: _____

Cidade: PASSA QUATRO UF: MG CEP: 37460-000

Credenciamento no CEA : SOLUÇÃO ALCOOLICA À 30%

Marca do Produto: _____

Região da amostra: PASSA QUATRO Data da Amostra: 26 / 08 / 02

| Análises Realizadas | Resultados | Parâmetros de Aprovação |
|--------------------------|------------|---------------------------------|
| Extrato seco | 12,92 | Mínimo 11% (m/v) |
| Cera | 0,54 | Máximo 1% do extrato seco (m/m) |
| Compostos flavonóides | 4,61 | Mínimo 0,50% m/m |
| Compostos fenólicos | 6,23 | Mínimo 0,25 m/m |
| Atividade de oxidação | 05 | Max 22 seg. |
| Acetato de chumbo | POSITIVO | Positivo |
| Hidróxido de sódio | POSITIVO | Positivo |
| Teor alcoólico | 68,16 | Máximo 70 ^o GL |
| Aspecto | LIMPIDO | Líquido límpido e homogêneo |
| Metanol | AUSENTE | Máximo 0,40 mg/l |
| Absorção de Radiações UV | 306 | Entre 200 a 400 nm |

Conclusão: A AMOSTRA APRESENTA - SE CONFORME OS PARÂMETROS DE APROVAÇÃO

Aspecto Microscópico: SEM PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS ESTRANHAS

Aspecto Organolépticos: SABOR E ODORES CARACTERÍSTICO

NOTA: Este resultado refere-se única e exclusivamente: Lote (x) amostra analisada ()

Taubaté, 30 / 08 / 02



ANEXO C – COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO CONSUMIDA PELOS ANIMAIS



NÍVEIS DE GARANTIA DO PRODUTO

| | |
|-------------------------------|---------|
| <i>Proteína Bruta (mín.)</i> | 22,00 % |
| <i>Cálcio (máx.)</i> | 1,4 % |
| <i>Fósforo (mín.)</i> | 0,8 % |
| <i>Extrato Etéreo (mín.)</i> | 4,0 % |
| <i>Matéria Fibrosa (máx.)</i> | 8,0 % |
| <i>Matéria Mineral (máx.)</i> | 10,0 % |
| <i>Umidade (máx.)</i> | 12,0 % |

ENRIQUECIMENTO POR KG DO PRODUTO

| | |
|--------------------------|-----------|
| <i>Vitamina A</i> | 25.000 UI |
| <i>Vitamina B1</i> | 8,0 mg |
| <i>Vitamina B2</i> | 30,0 mg |
| <i>Vitamina B6</i> | 14,0 mg |
| <i>Vitamina B12</i> | 40,0 mcg |
| <i>Vitamina D3</i> | 5.000 UI |
| <i>Vitamina E</i> | 60,0 mg |
| <i>Vitamina K</i> | 6,0 mg |
| <i>Biotina</i> | 0,1 mg |
| <i>Niacina</i> | 80,0 mg |
| <i>Ácido Fólico</i> | 3,0 mg |
| <i>Ácido Pantotênico</i> | 50,0 mg |
| <i>L-Lisina</i> | 1,2 % |
| <i>Metionina</i> | 0,45 % |
| <i>Zinco</i> | 70,0 mg |
| <i>Cobre</i> | 10,0 mg |
| <i>Colina</i> | 1200 mg |
| <i>Iodo</i> | 2,0 mg |
| <i>Manganês</i> | 70,0 mg |
| <i>Cobalto</i> | 1,5 mg |
| <i>Ferro</i> | 50,0 mg |
| <i>Selenio</i> | 0,1 mg |
| <i>Antioxidante</i> | 100 mg |

ANEXO D – MATERIAL SAFETY DATA SHEET (MSDS) DO BBN

SEÇÃO I PRODUTO QUÍMICO E IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA

Nome Químico : N-n-butyl-N-butan-4-ol-nitrosamina
Número do catálogo : B0938
Sinônimo: 1-Butanol, 4-(Butylnitrosamina)-(9CI)
Fórmula química CH₃(CH₂)N[(CH₂)OH]NO
Número CAS 3817-11-6

SEÇÃO II COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÃO SOBRE OS INGREDIENTES

Nome Químico : N-n-butyl-N-butan-4-ol-nitrosamina
Número CAS 3817-11-6
Porcentagem(%) 97% (GC)
TLV/PEL Este material químico é classificado como carcinógeno
Não há limite de exposição aceitável para este carcinógeno
Informação sobre a toxicologia : Rato LD 50 (oral) 1800 mg/kg
Camundongo LD 50 (subcutâneo) 3000 mg/kg

SEÇÃO III IDENTIFICAÇÃO DO RISCO

Efeitos agudos de saúde Prejudicial se ingerido ou inalado. Minimizar a exposição a este material. Uma severa exposição pode resultar em injúria ou morte. Siga instrução segura de prática de higiene e sempre vista equipamento protetor adequado quando manejar este componente

• **Efeitos crônicos de saúde**

Efeito carcinogênico: Não disponível

- **Efeito mutagênico:** Não disponível
- **Efeito teratogênico:** Não disponível
- Rato TDL0 (oral) 560mg/kg/6 semanas, continuamente
- Efeitos tóxicos:
 - Tumorigênicos- Carcinogênico por critérios RTECS
 - Rim, ureter e bexiga-tumores de rim
 - Tumorigênico - Incidência aumentada ou tumores em raças suscetíveis.
 - Camundongo TDL0 (oral) 800mg.kg.10 semanas, Intermitente.
 - Efeitos tóxicos:
 - Rim, ureter e bexiga – tumores.
 - Cachorro TDL0 (oral) gm.kg/2 anos, continuamente.
 - Efeitos tóxicos: Tumorigênicos- Carcinogênico por critérios RTECS
 - Rim, ureter e bexiga-tumores de rim

- Sangue-anemia normocítica
- Desenvolvimento da Toxicidade: Não disponível
- Não se sabe se repetida ou prolongada exposição a este componente pode agravar condições médicas pré-existentes.

SEÇÃO IV MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS

Contato com olho - Remova qualquer tipo de lentes de contato. In casos de contato, lave imediatamente os olhos com muito água por pelos menos alguns minutos. Procure ajuda médica

Contato com a pele -In caso de contato, lave imediatamente com muita água. Cubra a pele irritada com um emoliente. Remova roupas e sapatos contaminados. Lave a vestimenta antes de reusar. Limpe minunciosamente os sapatos antes de reusá-los. Procure ajuda médica

Inalação -Se a vítima não está respirando, faça respiração boca a boca. Afrouxe roupas apertadas como colarinho, cinto, gravata e . Se está respirando com dificuldade, oxigênio pode ser administrado. Procure ajuda médica se os problemas com a respiração não melhoram

Ingestão- Induza vômito colocando o dedo na garganta. Abaixee a cabeça para que o vômito não reentre na boca e garganta. . Afrouxe roupas apertadas como colarinho, cinto, gravatas. Se a vítima não está respirando, faça respiração boca a boca. Examine lábios e boca para ter certeza se há tecidos danificados, uma possível indicação que o material for ingerido; o ausência de tais sinais, contudo, não são conclusivos. PROCURE AJUDA MÉDICA IMEDIATAMENTE em caso de ingestão de material Radioativo.

SEÇÃO V INFORMAÇÃO SOBRE FOGO E EXPLOSÃO

Flamabilidade – Pode ser combustível em altas temperaturas. Pode explodir quando esquentado.

Auto-ignição – Não disponível

Limites flamáveis- Não disponível

Pontos de fagulha, - Não disponível

Produtos de combustão Estes produtos são tóxicos óxidos de carbono (CO, CO2) e óxidos de nitrogênio (NO, NO2)

Risco de Fogo - Não disponível

Risco de Explosão – Riscos de explosão do produto na presença de impacto mecânico: Não disponível. Riscos de explosão do produto na presença de descarga estática: Não disponível

Média de luta com o fogo

– PEQUENO INCENDIO: Use pó químico seco

- GRANDE INCENDIO : Use mangueira borrifadora de água , nevoa ou espuma.

NÃO USE JATO DE ÁGUA. Consulte com as autoridades de incêndio antes de tentar operações para apagar o fogo de larga escala.

SEÇÃO VI MEDIDAS DE ESCAPE ACIDENTAL

Derramar limpar – Material prejudicial. Explode quando esquentado. Material carcinogênico. Material muito sensível

Instruções – Limpe com material inerte e coloque o material derramado em um apropriado lixo. Consulte autoridades federais, estaduais e locais para assistência com este lixo.

SECÃO VII - MANUSEAMENTO E ESTOCAGEM

Informação sobre o manuseamento e estocagem

PREJUDICIAL. EXPLODE QUANDO ESQUENTADO. CARCINOGENICO. MUITO SENSÍVEL. Mantenha distância de calor. Pode reagir violentamente e/ ou envolver calor se exposto ao calor, choque ou fricção. Requer exaustor mecânico. Quando não está em uso, gentilmente feche o frasco e grande em locais secos e frios. Evite calor e luz excessiva. NÃO INGIRA. Não respire gás, vapor ou spray. Vista roupas protetoras apropriadas. Em caso de ventilação insuficiente, use equipamento respiratório apropriado. Se ingerido, procure conselho médico imediatamente e mostre frasco ou rótulo. Trate sintomaticamente e com medidas de suporte clínico. Evite contato com os olhos e pele. Sempre guarde longe de componentes incompatíveis como agentes ionizantes.

SEÇÃO VIII - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO PESSOAL

Engenharia de Controle Providencie exaustor ou outra engenharia de controle para manter a concentração dos vapores abaixo dos seus respectivos limiares valor limite

Tenha certeza de que o local para lavar os olhos e tomar banho está próximo ao local de trabalho.

Proteção Pessoal - Coloque óculos. Casacos de laboratório. Respirador de vapor. Botas. Luvas. O respirador aprovado por MSHA/NIOSH (Mine Safety and Health administration/ National Institute for Occupational safety and Health) deve ser usado para evitar inalação do produto. A vestimenta de proteção sugerida não deve ser suficiente, consulte um especialista antes de manejar o produto.

Limite de exposição- Este produto químico é classificado como carcinogéno.

Não há limite aceitável para exposição ao carcinogéno.

SEÇÃO IX PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Estado físico a 20oC – líquido

Gravidade específico-1.01

Peso molecular- 174.24

Ponto de fervura- Não disponível

Ponto de derretimento - Não disponível

Índice Refrativo- Não disponível

Temperatura crítica- Não disponível

Viscosidade- Não disponível

Solubilidade Não disponível -

Coefficiente de partição- Não disponível

Pressão de vapor- Não disponível

Densidade de vapor- Não disponível

Volatilidade- Não disponível

Odor - Não disponível

Sabor - Não disponível

SEÇÃO X INFORMAÇÃO SOBRE ESTABILIDADE E REATIVIDADE

Estabilidade – Este material é estável se estocado em condições apropriadas (Veja seção 7 para instruções).

Condições de instabilidade – Evite calor e luz excessiva. Muito sensível.

Incompatibilidade- Reagente com fortes agentes oxidantes.

SEÇÃO XI INFORMAÇÃO SOBRE TOXICOLOGIA

Número de RTECS EL1225000.

Rota de exposição – Contato com olho. Ingestão. Inalação.

Informação de toxicidade – Rato LD 50 (oral) 1800 mg/kg e

SEÇÃO XV OUTRAS INFORMAÇÕES DO REGULAMENTO E PICTOGRAMAS

Inventário Químico TSCA (EPA) Este produto não está no ato inventário de controle de substâncias tóxicas da EPA. As próximas notas são requeridas por CFR 720.36 (C) para aqueles produtos que não estão na lista do inventário:

1. Estes produtos são usados somente em pesquisas e desenvolvimento sobre supervisão de indivíduos tecnicamente qualificados como definido em 40 CFR 720.0 et seq
2. Os riscos de saúde causados por este produto, não têm sido determinado completamente. Qualquer informação que está ou se torne disponível vai estar no papel MSDS ?

Classificação WHMIS (Canadá) - Não disponível

Número EINECS (EEC) - Não disponível

EEC Risk Statements R5-Calor pode causar explosão

R45- Pode causar câncer

R20/21/22- Prejudicial se inalado, em contato com pele ou deglutido

Informação de regulação japonesa - Não disponível

SEÇÃO XVI OUTRAS INFORMAÇÕES

Versão 1.0

Validado em 13/11/2001

Impresso em 16/12/2005

Nota ao leitor

O laboratório químico TCI tem somente propósito de pesquisa e não tem intenção de uso deste produto como droga, aditivo de comida, utensílio doméstico ou pesticida. Acredita-se que a informação presente é correta, mas não está tudo incluído e deve ser usada somente como guia. Nem o nome do fornecedor acima citado nem qualquer dos seus subsidiários assumem qualquer falta da acurácia ou complementação da informação contida na presente informação. Determinação final do uso de qualquer material é somente responsabilidade do usuário. Todo reagente químico tem que ser manejado com o reconhecimento de que suas propriedades químicas, fisiológicas, toxicológicas e perigosas não foram completamente investigadas e determinadas. Todo reagente químico deve ser manejado somente por indivíduos que são familiares com seu potencial de risco, e que tenham sido completamente treinados em segurança apropriada, laboratório e procedimentos de manejo de material químico. Embora certos perigos tenham sido descritos nesta presente informação, não podemos garantir que somente estes perigos existem. Nossos MSDS são baseados somente em informação disponível no momento do embarque do material e são sujeitos a mudar sem nota como nova informação obtida. Evite longos períodos de estocagem pois o produto está sujeito a degradação com o tempo e pode se tornar perigoso e ariscado . É responsabilidade to usuário para requisitar uma atualização do papel MSDS para produtos que são estocados por longos períodos. Lixos de produtos não usados tem que ser empreendido por pessoas qualificadas com conhecimento em regulamentos aplicáveis e seguir todas as precauções de segurança pertinentes incluindo o uso de equipamento protetor apropriado (i.e.óculos protetores, roupa protetora, equipamento respiratório, máscara facial, touca para gases). Para manejo adequado e destino adequado aos resíduos, sempre cumpra regulações federais, estaduais e locais.

Número de Emergência (800) 424-9300

Impresso em 16/12/2005

ANEXO E – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L- LISINA

CERTIFICADO DE QUALIDADE DO CONTROLE DE QUALIDADE

1/4

Insumo: L-LISINA MONOHC...
 Lote : 040309
 Origem: Alemanha
 Fabric.: 03/2004
 Precedencia: Alemanha
 Validade: 03/2007

Formula: C6 H14 N2 O2 . HCl
 NCM : 2522.41.10
 Categoria Terapeutica: AMINOACIDO

PM: 182,55 Analise: 00016885 03/05/2004
 ICB: 0747.03-3 CAS: 55"-27-"



| Ensaio | Especificação | Resultado |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Advertencias | | |
| 3. Absorve unidade com facilidade | | |
| 5. Não deixar entrar em contato com olhos, pele ou nariz | | |
| *DESCRIÇÃO | PO CRISTALINO BRANCO OU CRISTAIS INCOLORS (FP), SABOR LEVEMENTE CARACTERISTICO (AAS). | DE ACCRDO |
| *SOLUBILIDADE | -FACILMENTE SOLUVEL NA AGUA E ACIDO FORMICO -POUCO SOLUVEL NO ALCOOL -PRATICAMENTE INSOLUVEL NO ETHER | DE ACCRDO |
| *IDENTIFICAÇÃO | E) REAÇÃO DOS CLORETOs POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VISIVEL: TRANSMITANCIA MIN. 98,0% (AAS) | DE ACCRDO |
| *PERDA P/SECAGEM | 100 - 115°C, EM 1,000g. MAX: 0,5% | 0,2% |
| *DOSEAMENTO | 98,5 - 101,0% SUBSTANCIA SECA | 99,61% |
| *pH | 5,0 - 6,0 (1,0 g; 10 ml H2O) | 5,2 |
| *DENSIDADE | | 0,90 g/mL |
| Análises adicionais realizadas pelo fabricante: | | |
| RESIDUO IGNIÇÃO | MENOR QUE 0,1% | 0,35% |
| CLORETO | 19,0 - 19,6% | 19,26% |
| ROT. ESPECIFICA | +20,4° A +21,4° | 21,15° |
| METAIS PESADOS | MENOR QUE 10 ppm | DE ACCRDO |
| ARSENICO | MENOR QUE 1 ppm | DE ACCRDO |
| FERRO | MENOR QUE 0,003% | DE ACCRDO |
| SULFATO | MENOR QUE 0,03% | DE ACCRDO |
| AMONIA | MENOR QUE 200 ppm | DE ACCRDO |
| TAM. PARTICULA | MAX. 5% | DE ACCRDO |
| IMP. ORG. VOLATIL | -METHYLENE CHLORIDE: MENOR QUE 50 ppm -CLOROFORMIO: MENOR QUE 50 ppm -TRICHLOROETHYLENE: MENOR QUE 50 ppm -1,4-DIOXANO: MENOR QUE 50 ppm | DE ACCRDO DE ACCRDO DE ACCRDO DE ACCRDO |
| MICROBIOLOGIA | TPC: MENOR QUE 3000 UFC/g STAPHYLOCOCCUS AUREUS: NEGATIVO SALMONELLA SPECIES: NEGATIVO ESCHERICHIA COLI: NEGATIVO BOLORES E LEVEDURAS: MENOR QUE 500 UFC/g | DE ACCRDO NEGATIVO NEGATIVO NEGATIVO DE ACCRDO |
| Monografia | FARMACOPEIA PORTUGUESA PAG. 200 AMINO ACIDS SPECIFICATIONS PAG. 116 MSDS LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE | |

Cop. para...
[Handwritten signature]

ANEXO F – PATENTE TRADUZIDA

Descrição da Invenção com diploma autoral

Instituto de Invenções e Racionalização

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Registro nº 79903 (22) Declarado 28.05.87 (23) Exposição Dados com prioridade (31) (32) (33) (45) Impressão 30.11.88 (46) Publicado em boletim 11 de 15.11.88 (56) Citados fontes de informação SU 585846 US 4382886 DK 133584 (61) (62) | (71) Declarado por Centro de biogênicos estimuladores Sofia (72) Criadores: Nikolai Tzvetanov Nikolov Nikolai Lukov Marekov Vasia Stefanova Bancova Simeon Simeonov Popov Sofia Rumiana Krumova Ignatova Svoqe Ivanka Kirilova Vladimirova |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

MÉTODO PARA OBTER A FÓRMA SOLÚVEL DA PRÓPOLIS EM ÁGUA

Método acha grande utilização em cosmética, medicina, indústria alimentar. Com ele obtenha-se a prática adequada, para uso forma da própolis desenvolvido em água, no qual consta todos os componentes biológicos ativos.

Própolis ou extrato total de álcool, são gerados com soluções de água do básico dos aminoácidos com relação da própolis e o ácido 1:0,5 até 1:0,3, assim é conduzida a forma solúvel de água da própolis com estabilidade em estado seco e em soluções de água.

MÉTODO PARA OBTER A FORMA SOLÚVEL DA PRÓPOLIS EM ÁGUA

A invenção trata-se, sobre o método de obter a forma solúvel da própolis em água no qual pode achar utilização em: cosmética, medicina e indústria alimentar.

Própolis é o produto derivado da resina, recolhido de abelhas., ela caracteriza-se por diferentes atividades biológicas – antibacteriana, antivírus, antimicótica, hepatoprotetora hepática, imunoestimulador, radioprotetora, hipotensivo, citostático, anti-inflamatório, antiácido e etc.

Por causa disto, a própolis se encontra grande utilização em cosmética, medicina e indústria alimentar.

Utilização dela é através da forma solúvel de álcool que contra indicado para várias doenças: úlcera, pulmão, feridas abertas nas crianças, etc.

Por causa disto, foram feitos vários experimentos para retirada de frações solúveis de água ou criação de formas solúveis de água da própolis. Devido a extração com água, são retirados alguns componentes químicos por exemplo:

Disaccharides .

As vezes é realizada a extração por etapas para própolis pura. Primeiro é separado a fração dissolvida em álcool, após isso o restante é extraído com misturas de água e álcool, contendo de 10 a 30% álcool .

Produz então a liofilização da fração solúvel de água, que constam de açúcar, proteínas, albumina, kreatinin , alkaline phosphatate , acidum folici , kalium, sodium (natrium), cálcio, zinco e outros, mas estão faltando Flavonoic Aglicons , solúveis de água, na base de quem

estão se devendo vários efeitos farmacológicos da própolis. Foram feitos vários experimentos Solubilização da própolis com aquecimento dentro de ambiente de água com magnésio glicosado ou citrato de sódio, em qual não ocorre desenvolvimento total.

Tarefa da invenção é para que seja desenvolvido o método, para obter uma prática forma de uso da própolis que pode ser solubilizada em água no qual contenha, todos os componentes biológicos ativos.

Conforme a invenção, este problema é resolvido de modo de obter a forma solúvel de água da própolis, como o própolis ou extrato de álcool total o último consta, todos os componentes biológicos ativos do própolis] e se prepara com soluções de água dos aminoácidos coma relação de: 1:0,5 até 1:3.

A solução obtida é estabilizada com Polivinilpoliridona (PVP) ou parecidos Polimeros, quando é necessário a prolongada conservação, a solução será liofilizada em relação da qual é obtido pó na cor amarelo-marrom, que é muito estável para ser conservado e bem desenvolvido em água (Sustente solução consta 5% Propilileno complexo).

Obtida a forma da solução aquosa do própolis, consta os principais componentes biológicos ativos: Flavonoids (Pinocebrin, Galagin, Chryzin, Pinobanksin – 3 – Acetate, Quercitin, Isorhamnetin, Kaemferol , Tectochrizin), Esters of Fenolic acids

(Ferulic e cafeína) com benzyl álcool, Phenetyl álcool, Izophentenylalcohol e Dimethylalcohol, pequenas quantidades livres ácidos Fenolicos, produtivos da Acetofenon, cera, Sterols superior massa de ácidos e outros.

Identificação destes componentes é utilizada com mas espectometria de massa e choque elétrico com um aumento programado de temperatura da prova em com cromatografia e espectometria, alta efetiva líquida chromatografia com cromatografia de camada fina.

Estas análises são realizadas com própolis e extrato de própolis e com forma solúvel de água.

A criada forma solúvel de água da própolis é estável em estado seco e em soluções com água, não é higroscópico e tem ótimo desenvolvimento em água – são produzidos limpos e estáveis soluções de água, ela se descompor rápido em ambiente ácido, em seguida são produzidos aminoácidos e própolis.

Dentro da forma solúvel de água, consta quantidade total de extrato do álcool que apresenta atividade da Polifenol fração da própolis.

Dependo do estado do componente da saída, dentro entra 20 – 25% Própolis. Assim o método criado conforme produto inventado, se distinguiu dos conhecidos produtos solúveis de água de própolis até agora incluindo só algumas frações solúveis da própolis.

A maneira fácil de obter forma da própolis solúvel em água, pelo método conforme a invenção, a estabilidade dela e conservação de todos os componentes biológicos ativos da própolis dento dela, estão dando oportunidades para ampliação do uso da própolis dentro da medicina cosmética e indústria de alimentos. Ela pode ser usada através da forma de soluções de água ou comprimidos e isso em casos quando não é possível utilizar soluções de álcool da própolis,

Graças de um bom desenvolvimento dentro d'água, se espera alta absorção das partes ativas do própolis. Devemos mencionar que doses diárias da própolis são dento de 250mg até 500mg (por exemplo: Aagaard própolis – comprimidos da Alemanha), quantidade do aminoácido por dia será abaixo de 1g. Na medicina são usados concentrados mais altos acima de 2g por dia, descobertas esclarecem com seguintes exemplos que não limitam a área de utilização.

Exemplo 1:

Própolis 100g se esfria até 2 – 4°C , partimos em 2 a 3 mm e peneiramos. Extraíram-se 3 vezes em, 800ml em etanol a 96% 1H na geladeira ao contrário. Extratos se filtram em ambiente quente e são deixados 12 H na temperatura 2 – 4°C, depois de novo são filtrados em sedimentos separados, são lavados com etanol frio. Os filtrados juntados, são vaporizadas através de vácuo seco e como resultado é obtido 60g de massa de resina, parte do estado do álcool (10g), acumulado em pequenas porções, mexendo sem parar por volta de 150ml 10% - e solução de água da D-arginina, com temperaturas de 50 até 60°C. Dentro do líquido obtido, são colocados 100ml 25% - e n, solução de água da Polivinilpirolidon (PVP), e após de mexer bem o líquido liofilizar.

Obtem-se na cor amarelo – marrom em estado de pó, que não é higroscópico, é bem dissolvido em água - resultado são limpas e com estabilidade 5% - em soluções aquosa.

Espectro infravermelho no liofilizado obtido, conforme o produto inventado – comprimidos Brometo de Potássio, pico de 1650 – 1660cm⁻¹(grupo carbônico em Flavonoids, 3100 – 3500cm⁻¹ associação hydroxilico grupos , 1400 – 1450cm⁻¹, 1270cm e etc.

UV – Ultravioleta , do complexo solúvel em água, não se diferencia pelas qualidades do própolis, porque picos de 290 tem mesma intensidade nos dois casos, os picos de 272 e 325, são menos intensivos com forma solúvel de água (10 – 20%).

A forma solúvel de água do própolis é analisada com ajuda da espectrometria de massa e cromatografia gasosa e cromatografia de camada fina.

Exemplo 2:

Própolis 100g e elaborado analógico no exemp.1 sem de ser usado polivinilhirolidon. Obtenha-se 25g de pó marrom.

Exemplo 3:

Própolis 100g e elaborado analógico no exemp.1 como parte de extrato de álcool (10g) e acumulado para 150ml 8%-em solução da L-lysine em água,após de quem e acumulado 100ml 15% - em solução de água da polivinilpirolidon (PVP).

Obtenha-se 37g produto de pó com cor amarelo-marrom.

Exemplo 4:

Própolis sustente (rico) 10g com medidas das partículas 2-3mm acumula-se em pequenas quantidades sem parar de mexer para 150ml 10%-em solução de L- arginina dentro da água antecipadamente aquecido ate 50-60° C. Depois de 30 minutos de mexer a solução deve resfriar no ambiente normal e depois e filtrada.

Junto a solução filtrada e acrescido 100ml 10%-em solução de pilivinilpirolidon (PVP), dentro de água a mistura deve ser bem mexida durante 30 minutos , e depois e filtrada novamente.

Depois da liofilização da solução filtrada,obtenha-se 31g de produto de pó com cor marrom.

Após a acidez da solução de água com concentrado da HCL e extrato de dietil eter.

Com a análise pela espectrometria de massa, do extrato de etanol da própolis e como assim explicado o modo da forma de solução de água (ionização com choque elétrico) e nos dois objetos são identificados (m+ e algumas principais fragmentações ionizantes): Pinocebrin, chryzin , tectochrisin , Phenthenylferulic, Phenthenylcaffeate, B - phenyl ethyl caffeate, kaemferol , isorhamnetin , Pinobanxin – 3- Acetate.

Análise na cromatografia de massa das provas é realizado antecipadamente da sididirane

Conteúdo dos principais componentes biológicos ativos do própolis conforme os dados da cromatografia gasosa na seguinte tabela.
As porcentagens, são indicados conforme dados

| Combinação | Extrato de ethanol (% no conteúdo) | Forma obtida da solução de água (conteúdo) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1 . Caffeic acid | 4,3 | 6,7 |
| 2 . G – dimethyl – allyl ferrolate | 1,0 | 1,2 |
| 3 . Isopentyl – 2 – enyl – caffeate | 4,6 | 7,4 |
| 4 . Penthenyl caffeate | 2,2 | 2,2 |
| 5 . Dimethyl caffeate | 5,9 | 8,5 |
| 6 . Pinocebrin | 24,5 | 9,2 |
| 7 . Pinobanksin | 6,2 | 2,3 |
| 8 . Pinobanksin – 3 – acetate | 8,8 | 13,6 |
| 9 . Ben - zyl caffeate | 2,5 | 0,4 |
| 10 . Galangin | 6,0 | 7,8 |
| 11 . B - phenyl ethyl caffeate | 6,8 | 1,2 |
| 12 . Total flavonoids | 45,5 | 32,9 |
| 13 . Total esters of phenyl acid | 23,0 | 20,9 |

Exemplo 6:

Própolis 10g, se acrescenta em partes para antecipação preparada, solução de 15g L – Arginin e 25g de Polivinilpirolidon (PVP), dentro de 200ml de água com 50 – 60°C. O acréscimo é efetuado dentro de 30 min sem parar de mexer. Após mais 3H de preparo, a solução é filtrada e o filtro é sujeito são colocados para liofilização. Obtenha-se 46,2g, produto em forma de pó com cor marrom.

Patente do autor

Método para obter a forma solúvel da própolis ou extrato dele, caracterizado com o seguinte: A própolis ou total extrato de álcool, é preparado com soluções de água na base de aminoácidos com relação da própolis e o ácido 1:0,5 até 1:3.