

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/03/2021.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



JOSÉ NUNES CARNEIRO NETO

**ANÁLISE DO EFEITO QUIMIOPREVENTIVO, CITOPROTETOR E CITOTÓXICO
DO TERPINEN-4-OL EM RATOS SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS DE LÍNGUA,
HEPATOPATAS E NEFROPATAS INDUZIDOS POR ÓXIDO DE 4-
NITROQUINOLINA**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



JOSÉ NUNES CARNEIRO NETO

**ANÁLISE DO EFEITO QUIMIOPREVENTIVO, CITOPROTETOR E CITOTÓXICO
DO TERPINEN-4-OL EM RATOS SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS DE LÍNGUA,
HEPATOPATAS E NEFROPATAS INDUZIDOS POR ÓXIDO DE 4-
NITROQUINOLINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof.º Dr. Cleverton Roberto de Andrade.

Araraquara

2017

Carneiro Neto, José Nunes

Análise do efeito quimiopreventivo, citoprotetor e citotóxico do Terpinen-4-ol em ratos saudáveis e oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas induzidos por Óxido de 4-Nitroquinolina/ José Nunes Carneiro Neto. -- Araraquara: [s.n.], 2017

102 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Diagnóstico e Cirurgia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

1. Neoplasias da língua 2. 4-Nitroquinolina-1-Óxido
3. Monoterpenos I. Título

JOSÉ NUNES CARNEIRO NETO

**ANÁLISE DO EFEITO QUIMIOPREVENTIVO, CITOPROTETOR E CITOTÓXICO
DO TERPINEN-4-OL EM RATOS SAUDÁVEIS E ONCOLÓGICOS DE LÍNGUA,
HEPATOPATAS E NEFROPATAS INDUZIDOS POR ÓXIDO DE 4-
NITROQUINOLINA**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

2º Examinadora: Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato

Araraquara, 14 de março de 2017

DADOS CURRICULARES

JOSÉ NUNES CARNEIRO NETO

NASCIMENTO: 27/05/1983 – Candéal – Bahia

FILIAÇÃO: José Gibeval Nunes Carneiro

Tecla Maria Pereira dos Santos Carneiro

2008 – 2013: Curso de Graduação em Odontologia

Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

2013 – 2014: Aperfeiçoamento em Cirurgia Bucomaxilofacial

Instituto de Formação e Aperfeiçoamento Profissional – IFAP

2014 – 2015: Especialização em Saúde da Família

Universidade de Brasília – UNB

2015 – 2017: Mestrado em Ciências Odontológicas

Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA

Ao Deus todo poderoso, **Jesus Cristo**, pela benção, proteção, fé e luz divina derramada sobre o meu corpo e caminho percorrido.

Aos meus pais queridos, **José Gibeval Nunes Carneiro e Tecla Maria Pereira dos Santos Carneiro**, responsáveis por esta vitória abençoada na minha vida pessoal e profissional.

À minha amada irmã, **Técia Maria**, seu esposo, **Gilberto**, e toda à minha, **Família**, pelas suas disposições incansáveis em me ajudar nos momentos fáceis e difíceis dessa trajetória.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade**, pelo apoio, incentivo, respeito, ensinamento, retidão, profissionalismo, confiança, sinceridade, simplicidade e amizade, entre outras características que contribuíram de forma inigualável no desenvolvimento do meu conhecimento pessoal e profissional. Muito lhe agradeço por compartilhar seu conhecimento intelectual para o meu crescimento pessoal e profissional.

Em especial com enorme gratidão, à **Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pelo apoio, respeito, acolhimento, profissionalismo, confiança, simplicidade e amizade.

“Adquirir sabedoria vale mais do que ouro, e adquirir inteligência é melhor do que prata. Feliz é quem descobre a sabedoria e adquire a inteligência!... Porque é o Senhor DEUS quem nos dá a sabedoria, de sua boca procedem à ciência e o entendimento”. (PROVÉRBIOS 16;2-3)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual de São Paulo, na pessoa de sua Diretora, **Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Ao **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, e ao **Prof. Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho**, Coordenador da Área de Diagnóstico e Cirurgia da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, ambos os professores por sua fidalguia, educação e respeito.

Aos **Professores Doutores Osmir Batista de Oliveira Junior, Paulo Sérgio Cerri, Claudia Maria Navarro e Valfrido Antonio Pereira Filho**, pelas colaborações intelectuais nos exames de qualificações.

Aos **Professores Doutores Daniel Araki Ribeiro, Iguatemy Lourenço Brunetti, Amanda Martins Baviera e Juliane Maria Guerreiro Tonamaru**, pelo respeito, educação, competência, responsabilidade e colaboração concedida ao meu projeto de pesquisa.

Às **Professoras Doutoras Marisa Aparecida Cabrini Gabrielle e Claudia Maria Navarro**, pelas orientações e responsabilidades nos estágios docências.

A todos os **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**, expresso a minha sincera gratidão e admiração pela competência e seriedade com que conduzem as atividades diárias de ensino e pesquisa nesta tão renomada universidade.

A todos os **colegas, Carlos Arcaro Filho, Thais Moreira, Juliana Sorbo, Marina Reis e Jeffersson Gutierrez**, por compartilharem comigo os seus mais profundos conhecimentos em pesquisa experimental da Farmácia e Odontologia, além dos exemplos de amizade, dedicação, profissionalismo e cuidados clínicos com os pacientes.

Às alunas de iniciação científica do curso de Farmácia e Odontologia, **Natália Sato**, **Taís Melo**, **Beatriz Bortotti** e **Jennyfer Bramé**, pelo apoio, dedicação e responsabilidade no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao assistente técnico da disciplina de patologia, **José Antonio Sampaio Zuanon**, pelo apoio, respeito e confiança no desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que estiveram do meu lado em algum momento da minha vida, dando coragem e força na superação dos obstáculos e na composição dessa nova trajetória de minha vida.

“Tenho um segredo prá isso, que só o tempo lhe dá, e não se pode ter medo, nem de seguir e nem de sonhar”. (Música: De bem com a vida)

Carneiro Neto JN. Análise do efeito quimiopreventivo, citoprotetor e citotóxico do terpinen-4-ol em ratos saudáveis e oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas induzidos por óxido de 4-nitroquinolina [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O terpinen-4-ol (TP-4-ol) é um monoterpene que constitui de 30-48% dos quimiotipos de óleos essenciais de plantas, como a *Melaleuca alternifolia*, laranja, pimenta entre outras, apresentando propriedade anti-inflamatória, anticancerígena entre outras, caracterizadas como agentes quimiopreventivos e citoprotetores, respectivamente, contra as lesões com potencial de malignização e/ou malignas (LPMM) de língua e as hepato ou nefrotoxicidade. Sendo assim, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o TP-4-ol quanto às propriedades quimiopreventivas sobre LPMM de língua e citoprotetoras ou citotóxicas sobre o fígado e rim de ratos quimicamente induzidos por óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO). Além disso, avaliamos o TP-4-ol quanto ao seu potencial indutor de hepato e nefrotoxicidade em ratos saudáveis. Os 64 ratos foram divididos aleatoriamente para o experimento de 16 semanas, nos grupo 1 ratos saudáveis ou grupo 2 ratos oncológicos de língua (n=8) e os grupos de intervenções com [g/Kg de TP-4-ol] ratos saudáveis tratados [0,035] do grupo 3 e [0,0035] grupo 4, ratos oncológicos tratados [0,035] do grupo 5 e [0,0035] grupo 6 (n=12). Foram analisados os parâmetros biométricos (peso do corpo, língua, fígado e rim; consumo de água e ração); bioquímicos do fígado (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina) e rim (ureia e creatinina); macroscópicos da língua (tamanho e lesões fundamentais), fígado e rim (tamanho); e microscópicos da língua (alterações histopatológicas, risco de malignização da displasia moderada, invasão tumoral e infiltrado inflamatório), fígado e rim (alterações citotóxicas). Os resultados foram comparados entre médias e desvio-padrão por ANOVA com nível de significância de 5%. As análises dos 63 ratos demonstraram aumento do peso corporal e consumo de água com 0,0035g/Kg de TP-4-ol do grupo 6, que também reduziu os parâmetros bioquímicos, lesões fundamentais, alterações histopatológicas, o alto risco de malignização, carcinoma lingual em mais de 70% (in situ, micro-invasivo e invasivo) e o infiltrado inflamatório. A dose de 0,035g/Kg de TP-4-ol do grupo 3 é tóxica nos parâmetros analisados com exceção do microscópico do fígado. Conclui-se que o TP-4-ol é eficaz na quimioproteção (0,035/0,0035g/Kg - quimioprevenção) de lesões com potencial de malignização e/ou malignas de língua, citoprotetora (0,0035g/Kg) de hepato e nefrotoxicidade de ratos oncológicos e indutora de leve nefrotoxicidade (0,035g/Kg) em ratos saudáveis.

Palavras-chave: Neoplasias da língua. 4-Nitroquinolina-1-Óxido. Monoterpenos.

Carneiro-Neto JN. Analysis of the chemopreventive, cytoprotective and cytotoxic effect of terpinen-4-ol in healthy and oncological rats of tongue, hepatopaths and nephropaths induced by 4-nitroquinoline oxide [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Terpinen-4-ol is a monoterpene constituting 30-48% of the plants essential oils chemotypes, such as *Melaleuca alternifolia*, orange tree, peppermint among others, presenting anti-inflammatory, anticancer property among others, characterized as chemopreventive agents and cytoprotectants, respectively, against lesions with malignant and/or malignization potential of tongue and hepato or nephrotoxicity. Therefore, the aim of our study was to evaluate TP-4-ol for chemopreventive properties on tongue and cytoprotective or cytotoxic LPMM on the liver and kidney of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) chemically induced rats. In addition, we evaluated TP-4-ol as to its potential for inducing hepate and nephrotoxicity in healthy rats. The 64 rats were randomly divided to the 16-week experiment, in group 1 healthy rats or group 2 oncological rats of tongue (n = 8) and groups of interventions with [g/kg of TP-4-ol] treated healthy rats [0.035] of group 3 and [0.0035] group 4, treated oncological rats [0.035] of group 5 and [0.0035] group 6 (n = 12). Were analyzed the biometric parameters (weight of body, tongue, liver and kidney, water and feed intake); biochemical of liver (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase) and kidney (urea and creatinine); macroscopic of tongue (size and fundamental lesions), liver and kidney (size); and microscopic of the tongue (histopathological alteration, risk of malignization of moderate dysplasia, tumor invasion and inflammatory infiltrate), liver and kidney (cytotoxic alterations). The results were compared between means and standard deviation by ANOVA with a significance level of 5%. The analysis of the 63 rats showed an increase in body weight and water consumption with 0.0035g/kg of TP-4-ol from group 6, which also reduced biochemical parameters, fundamental lesions, histopathological alterations, high risk of malignancy, lingual carcinoma in more than 70% (in situ, micro-invasive and invasive) and inflammatory infiltrate. The dose of 0.035g/kg of TP-4-ol of group 3 is toxic in the analyzed parameters except for the microscopic of the liver. It is concluded that TP-4-ol is effective in chemoprotection (0.035/0.0035g/kg - chemoprevention) of lesions with malignant and/or malignization potential of tongue, cytoprotective (0.0035g/kg) of hepate and nephrotoxicity of oncological rats and inductor of mild nephrotoxicity (0.035g/kg) in healthy rats.

Keywords: Tongue Neoplasms. 4-Nitroquinoline-1-oxide. Monoterpenes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina transaminase

AST: Aspartato transaminase

CEC: Carcinoma espinocelular ou de células escamosas

CCP: Câncer de cabeça e pescoço

DNA: Ácido desoxirribonucléico

G1: Grupo 1 de ratos saudáveis

G2: Grupo 2 de ratos oncológicos/4-NQO

G3: Grupo 3 de ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol

G4: Grupo 4 de ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol

G5: Grupo 5 de ratos oncológicos/4NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol

G6: Grupo 6 de ratos oncológicos/4NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol

HPV: Vírus do papiloma humano

H₀: Hipótese nula

H₁: Hipótese alternativa

H&E: Hematoxilina & Eosina

IV: Intravenosa

LPMM: Lesões com potencial de malignização ou malignas

mg/dL: Miligramas por decilitro

mg/Kg: Miligramas por quilo

mm: Milímetros

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SUS: Sistema único de saúde

TP-4-ol: Terpinen-4-ol

TTO (*Tea tree Oil*): Óleo da árvore do chá

U/L: Unidades por litro

4-NQO: Óxido de 4-Nitroquinolina

µL: microlitro

µm: micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Carcinoma de Língua.....	15
2.2	Carcinogênese Lingual e Citotoxicidade Renal e Hepática em Animais induzidos pelo Óxido de 4-Nitroquinolina.....	18
2.3	Quimioprevenção de Carcinogênese Lingual.....	19
2.4	Citoproteção de Citotoxicidade Renal e Hepática.....	22
2.5	Quimiotipos do Óleo da Árvore do Chá.....	23
2.6	Terpinen-4-ol.....	24
2.7	A Importância de Parâmetros para Análises da Quimioprevenção, Citoproteção e Citotoxicidade do Terpinen-4-ol em Ratos Saudáveis e Oncológicos Induzidos por Óxido de 4-Nitroquinolina.....	27
2.7.1	Parâmetros biométricos.....	28
2.7.2	Parâmetros bioquímicos.....	28
2.7.3	Parâmetros macroscópicos.....	29
2.7.4	Parâmetros microscópicos.....	30
3	PROPOSIÇÃO.....	31
4	MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1	Instituição do Tratamento com o Terpinen-4-ol.....	33
4.2	Ensaio In Vivo.....	33
4.3	Sacrifício.....	35
4.4	Análise de Parâmetros Biométricos.....	35
4.5	Análise de Parâmetros Bioquímicos.....	36
4.6	Análise de Parâmetros Macroscópicos.....	37
4.7	Análise de Parâmetros Microscópicos.....	37
4.8	Expressões dos Resultados e Análises Estatísticas.....	42
5	RESULTADO.....	43
5.1	Análise de Parâmetros Biométricos.....	43
5.2	Análise de Parâmetros Bioquímicos.....	46
5.3	Análise de Parâmetros Macroscópicos.....	49
5.4	Análise de Parâmetros Microscópicos.....	53
6	DISCUSSÃO.....	77

7	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL.....	100

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer de cabeça e pescoço (CCP), especificamente o carcinoma espinocelular ou de células escamosas (CEC) de cavidade oral, caminha para se tornar a principal causa de morbidade e mortalidade na população mundial (Bray et al.¹², 2012; International Agency for Research on Cancer, World Health Organization⁴⁵, 2012).

Dentre eles, o carcinoma de língua representa 70% dos CEC de cavidade oral em adultos, com um recente aumento na incidência em jovens (Patel et al.⁷⁸, 2011; Toporcov et al.¹¹¹, 2015). Na maioria das vezes, esses tumores são diagnosticados em estádios avançados III e IV (Krishnatreya et al.⁵³, 2015) e a sobrevida em 5 anos apresenta-se em torno de 78% para região posterior e 61% para região anterior da língua (Garzino-Demo et al.³³, 2016).

Devido ao frequente diagnóstico avançado, os tratamentos costumam ser complexos, multidisciplinares e de altos custos, envolvendo cirurgia, radioterapia e por vezes a quimioterapia. Essa última, por vezes, levando o paciente a apresentar comorbidades sistêmicas que afetam rins e fígado (Divi et al.²¹, 2016).

Na última década, as novas modalidades de tratamento do câncer avançado de língua produziram pouco efeito no prognóstico dos pacientes. Por consequência, retornou-se a implementação de tratamentos quimiopreventivos de baixo custo e eficazes em estádios iniciais da doença (He et al.⁴⁰, 2016). Nesta vertente, estudos tentam identificar novas opções de tratamento, utilizando compostos naturais (Bundela et al.¹⁴, 2015) que apresentam boa aceitação e sensação de segurança para a maioria dos pacientes oncológicos (Saba et al.⁹⁰, 2015; William, Papadimitrakopoulou¹¹⁷, 2013).

A quimioprevenção pode ser realizada com agentes naturais, consistindo de um mecanismo de controle, regressão ou interrupção na fase de iniciação, promoção e progressão de lesões com potencial de malignização ou malignas (LPMM) (Saba et al.⁹⁰, 2015; Shrotriya et al.⁹⁷, 2015). A citoproteção envolve agentes e mecanismos quimiopreventivos contra à citotoxicidade renal e hepática (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

O óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) e seu metabólito reduzido 4-hidroxiaminoquinolina-1-óxido (4-HAQO) produzem ligações covalentes em macromoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, além de induzir mutações e

estresse oxidativo pela formação de hidrocarbonetos policíclicos, algumas vezes também induzindo toxicidade renal e hepática (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Sun et al.¹⁰⁴, 2010; Tada, Tada¹⁰⁷, 1975; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011). Estas características associadas ao fato de que esta substância mimifica lesões orais iniciais e avançadas, presentes no desenvolvimento de carcinomas orais em humanos, caracterizam este modelo como “ideal” para o estudo de agentes quimiopreventivos na fase 0 (pré-clínica) do ensaio clínico (Reid et al.⁸⁷, 2011).

Os monoterpenos estão presentes em óleos essenciais de plantas e são denominados de quimiotipos (Gershenzon, Dudareva³⁵, 2007; Groot, Schmidt³⁸, 2016). O álcool perfílico e limoneno, classificados como quimiotipos, foram recentemente estudados em tratamentos clínicos contra câncer em humanos (ensaio clínico de fase II) (Sobral et al.¹⁰⁰, 2014).

O terpinen-4-ol (TP-4-ol) tipo I constitui de 30 a 48% dos quimiotipos derivados dos óleos da *Melaleuca alternifolia* (*Tea Tree Oil* – TTO – ISO) (Groot, Schmidt³⁸, 2016), mas também está presente em óleos de laranjeira, tangerineira, limoeiro, cedro e pimenteira (Pino et al.⁸⁴, 2003).

Algumas características do TP-4-ol já foram descritas em estudos *in vitro* e *in vivo*, tais como: bactericida geral e oral (Budzyńska et al.¹³, 2011; Cha et al.¹⁸, 2007; Yang et al.¹²⁰, 2011), antifúngica (Mertas et al.⁶⁶, 2015), antiparasitária (Baldissera et al.⁸, 2016), antivirótica (Garozzo et al.³², 2011), relaxante da musculatura lisa vascular (Maia-Joca et al.⁶², 2014), hipotensiva (Lahlou et al.⁵⁵, 2003), anticonvulsivante (Nóbrega et al.⁷⁴, 2014), anti-inflamatória (Bakkali et al.⁹, 2008) e antioxidante (Barra et al.¹¹, 2007). Além disso, observamos o potencial quimiopreventivo em trabalhos que relataram atividade anticancerígena (Shapira et al.⁹⁵, 2016; Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Shapira et al.⁹⁵ (2016) e Wu et al.¹¹⁸ (2012) em estudo *in vitro* e *in vivo* com exposição à 0,005-0,01% e 0,06-0,1% de TP-4-ol, verificaram atividade anticancerígena por indução de apoptose contra células de tumores de coloretais humanas e células pequenas de tumores pulmonares de camundongos. Os autores relataram que a indução de apoptose ocorreu pela via intrínseca mitocondrial na fase sub-G₁ da divisão celular, mas que também ocorreu a indução de necrose e inibição da proliferação celular na fase G₂ ou mitótica da divisão celular.

Utilizando modelos de xenoenxertos, os autores também relataram que a administração sistêmica de 4mg de TP-4-ol (sem relato de via de administração), 2

vezes por semana durante 3 semanas e 0,1% (100µL) via intravenosa, diariamente, durante 18 dias, apresentaram redução de mais de 70% do volume e peso tumoral, induzindo apoptose e inibindo proliferação celular, sem apresentar quaisquer efeitos adversos (Shapira et al.⁹⁵, 2016; Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Entretanto, embora o modelo de xenoenxerto propicie dados sistêmicos importantes, o uso de animais imunossuprimidos e de tumores clonais nos diferentes animais do estudo limita a extrapolação dos resultados tornando-os específicos para as células analisadas e suprimem os efeitos do sistema imunológico no tratamento realizado.

O modelo de quimioprevenção em ratos oncologicamente induzidos por 4-NQO propicia um salto na análise, pois induz o surgimento de carcinomas por oxidação do material genético, de maneira semelhante ao que é observado em humanos, aumentando a variabilidade genética dos tumores formados. Além disso, o acompanhamento gradual dos animais permite a análise de parâmetros biométricos (Shrotriya et al.⁹⁸, 2015), bioquímicos (Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011), macroscópicos (Grawish et al.³⁷, 2011; Piña-Zentella et al.⁸³, 2016; Salama et al.⁹¹, 2012; Shuvy et al.⁹⁹, 2011) e microscópicos (Gautam et al.³⁴, 2014). Sendo assim, ao instituímos um tratamento, permite acompanhar os efeitos quimiopreventivos e/ou citoprotetores sobre a indução carcinogênica lingual e possível toxicidade renal ou hepática (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Nauta et al.⁷³, 1995; Suzuki et al.¹⁰⁵, 2006).

Como visto, a associação das análises de parâmetros biométricos, bioquímicos, macroscópicos e microscópicos permite a construção de um quadro geral de exposição à substância experimental.

Do ponto de vista farmacodinâmico, o TP-4-ol foi descrito como de duração prolongada com estabilidade de concentração à temperatura de 25°C por 24 horas e meia-vida plasmática de 2 horas e 20 minutos (Chooluck et al.¹⁹, 2013).

Sendo assim, considerando os resultados anteriormente relatados em estudos *in vitro* e *in vivo* (Shapira et al.⁹⁵, 2016; Wu et al.¹¹⁸, 2012), o objetivo de nosso estudo foi avaliar o TP-4-ol quanto às propriedades quimiopreventivas sobre LPMM de língua e citoprotetoras ou citotóxicas sobre o fígado e rim de ratos quimicamente induzidos por 4-NQO. Além disso, avaliamos o TP-4-ol quanto ao seu potencial indutor de hepato e nefrotoxicidade em ratos saudáveis.

7 CONCLUSÃO

As doses testadas demonstraram eficácia quimiopreventiva contra o desenvolvimento carcinogênico induzido por 4-NQO. A concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol demonstrou menor número de lesões fundamentais na análise macroscópica, menor número de alterações histopatológicas em diferentes regiões da língua dos ratos, menor número de alterações displásicas leves e menor risco de malignização da displasia moderada com menor perda de polaridade das células basais, ausência de cristas epiteliais em forma de gota, ausência de mitoses atípicas, ausência de anisonucleose, redução de pleomorfismo nuclear e redução de células com relação núcleo/citoplasma aumentada. Além disso, foi capaz de reduzir o número de carcinomas linguais em relação ao grupo controle positivo. Essa redução ocorreu em carcinoma in situ, micro-invasivo e invasivo.

A concentração de 0,035g/Kg de TP-4-ol também demonstrou capacidade de reduzir o efeito carcinogênico de 4-NQO. Essa concentração reduziu o número de alterações histopatológicas em varias regiões da língua dos animais previamente submetidos ao carcinógeno 4-NQO, reduzindo o número de lesões hiperplásicas, o número geral de lesões displásicas (leve + moderada + grave) e a presença de lesões displásicas moderadas na região de dorso lingual. Do mesmo modo, reduziu o risco de malignização das displasias moderadas em relação ao controle positivo, evidenciada com menor presença de anisonucleose. Essa dose também foi capaz de reduzir a presença de carcinomas in situ.

Por outro lado, evidenciamos alterações toxicológicas de 4-NQO e das doses testadas, tanto em parâmetros bioquímicos quanto histopatológicos.

O 4-NQO foi capaz de alterar os resultados bioquímicos de ALT, ALP, uréia e creatinina. Além disso, o 4-NQO foi capaz de produzir alterações histopatológicas leves nos rins.

A concentração de 0,035g/Kg de TP-4-ol nos animais apenas expostos a essa substância produziu aumento nos resultados bioquímicos de ALT, ALP, uréia e creatinina. Inclusive tendo resultados superiores aos obtidos pelo grupo 4-NQO em ALP e uréia. Essa concentração também demonstrou alterações histopatológicas leves nos rins.

A concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol nos animais expostos exclusivamente a essa substância, alterou os parâmetros bioquímicos de ALP e

creatinina, mas demonstrou capacidade de reduzir os efeitos bioquímicos da prévia exposição ao 4-NQO em ALT, ALP, uréia e creatinina. Entretanto, as análises histopatológicas renais demonstraram presença de citotoxicidade leve a moderada, essa última, em maior número e estatisticamente diferente do controle negativo. Nesse grupo observamos ductos distais necróticos, ductos proximais necróticos, glomérulos necróticos, acúmulo de pigmento intracelular amarelado e acúmulo de pigmento amarelado intraglobular.

REFERÊNCIAS*

1. Abbasi MM, Khiavi MM, Monfaredan A, Hamishehkar H, Seidi K, Jahanban-Esfahlan R. DOX-MTX-NPs augment p53 mRNA expression in OSCC model in rat: effects of IV and oral routes. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(19):8377-82.
2. Aloia TPA, Cogliati B, Guerra RR, Parra OM, Dagli MLZ, Hernandez-Blazquez FJ. Modelo de suplementação nutricional com fatores hepatotróficos aumenta proliferação celular em fígado de ratos saudáveis. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010; 62(4): 853-61.
3. Amacher DE. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(5):253-62.
4. Arima Y, Nishigori C, Takeuchi T, Oka S, Morimoto K, Utani A, et al. 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicol Sci*. 2006;91(2):382-92.
5. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res*. 2010;24(5):673-9.
6. Avgoustidis D, Nisyrios T, Nkenke E, Lijnen R, Ragos V, Perrea D, et al. Oral carcinogenesis is not achieved in different carcinogen-treated PAI-1 transgenic and wild-type mouse models. *In Vivo*. 2012;26(6):1001-5.
7. Bagshaw SM, Gibney RT. Conventional markers of kidney function. *Crit Care Med*. 2008;36(4 Suppl):S152-8.
8. Baldissera MD, Grando TH, Souza CF, Gressler LT, Stefani LM, da Silva AS, et al. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol*. 2016;162:43-8.
9. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446-75.
10. Barbosa LCA, Silva CJ, Teixeira RR, Meira RMSA, Pinheiro AL. Chemistry and biological activities of essential oils from *Melaleuca L.* species. *Agric Conspec Sci*. 2013;78(1):11-23.
11. Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P, Angioni A. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus L.* from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2007;55(17):7093-8.
12. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012; 13(8): 790-801.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAR, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalembe D, Różalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol.* 2011;60(1):35-41.
14. Bundela S, Sharma A, Bisen PS. Potential compounds for oral cancer treatment: Resveratrol, Nimbolide, Lovastatin, Bortezomib, Vorinostat, Berberine, Pterostilbene, Deguelin, Andrographolide, and Colchicine. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141719.
15. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(2): 349-60.
16. Carrington C. Oral targeted therapy for cancer. *Aust Prescr.* 2015;38(5):171–6.
17. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):50-62.
18. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Moon SE, Kil BS, Yun SI, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytother Res.* 2007;21(3):295-9.
19. Chooluck K, Singh RP, Sathirakul K, Derendorf H. Plasma and dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol in rats following intravenous administration. *Pharmazie.* 2013;68(2):135-40.
20. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001; 21(1): 15-23.
21. Divi V, Tao L, Whittemore A, Oakley-Girvan I. Geographic variation in Medicare treatment costs and outcomes for advanced head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2016;61:83-8.
22. Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J Hosp Infect.* 2004;56(4):283-6.
23. Eek D, Krohe M, Mazar I, Horsfield A, Pompilus F, Friebe R, et al. Patient-reported preferences for oral versus intravenous administration for the treatment of cancer: a review of the literature. *Patient Prefer Adherence.* 2016;10:1609-21.
24. Federman DG, Kirsner RS. The patient with skin disease: an approach for nondermatologists. *Ostomy Wound Manage.* 2002;48(6):22-8.
25. Federman DG, Reid M, Feldman SR, Greenhoe J, Kirsner RS. The primary care provider and the care of skin disease: the patient's perspective. *Arch Dermatol.* 2001;137(1):25-9.

26. Finn A, Bondarenka C, Edwards K, Hartwell R, Letton C, Perez A. Evaluation of electronic health record implementation on pharmacist interventions related to oral chemotherapy management. *J Oncol Pharm Pract.* 2016;0(0):1-12.
27. Fong LY, Jiang Y, Farber JL. Zinc deficiency potentiates induction and progression of lingual and esophageal tumors in p53-deficient mice. *Carcinogenesis.* 2006;27(7):1489-96.
28. Fong LY, Jiang Y, Rawahneh ML, Smalley KJ, Croce CM, Farber JL, et al. Zinc supplementation suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2011;32(4):554-60.
29. Fujino H, Chino T, Imai T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *J Natl Cancer Inst.* 1965; 35(6): 907-18.
30. Gama RR, Giovanini A, de Rosa FS, Ogata DC, de Oliveira AL, Cardoso Costa AF, et al. Chemopreventive effects of the polyunsaturated fatty acids omega-3 on the carcinogenesis process of the upper aerodigestive tract induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in Swiss mice. *Ecancermedicalscience.* 2014;8:392.
31. Gambino A, Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Conrotto D, Tanteri C, et al. Clinical features and histological description of tongue lesions in a large Northern Italian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(5):e560-5.
32. Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action. *Antiviral Res.* 2011;89(1):83-8.
33. Garzino-Demo P, Zavattoni E, Franco P, Fasolis M, Tanteri G, Mettus A, et al. Parameters and outcomes in 525 patients operated on for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44(9):1414-21.
34. Gautam MK, Goel RK. Toxicological study of *Ocimum sanctum* Linn Leaves: hematological, biochemical, and histopathological studies. *J Toxicol.* 2014; 2014: 135654.
35. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* 2007;3(7):408-14.
36. Gonçalves V de P, Ortega AA, Guimarães MR, Curylofo FA, Rossa Junior C, Ribeiro DA, et al. Chemopreventive activity of systemically administered curcumin on oral cancer in the 4-nitroquinoline 1-oxide model. *J Cell Biochem.* 2015;116(5):787-96.
37. Grawish ME, Zyada MM, Zaher AR. Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. *Med Oncol.* 2011;28(4):1163-8.

38. de Groot AC, Schmidt E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis*. 2016;75(3):129-43.
39. Harkenthal M, Hausen BM, Reichling J. 1,2,4-Trihydroxy menthane, a contact allergen from oxidized Australian tea tree oil. *Pharmazie*. 2000;55(2):153-4.
40. He Q, Chen Z, Cabay RJ, Zhang L, Luan X, Chen D, et al. microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. *Oral Oncol*. 2016;57:15-20.
41. Helli S, Damghani H, Mohajeri D, Mesgari Abbasi M, Attaran R, Zahed M. Evaluation of the effect of two different systemic doses of *Viola Odorata* on prevention of induced tongue dysplasia in rats. *J Dent (Shiraz)*. 2016;17(3):185-92.
42. Hipólito RA, Martins CR. Prevalence of oral mucosal alterations in Brazilian adolescents held in two juvenile re-education centers. *Cien Saude Colet*. 2010;15 Suppl 2:3233-42.
43. Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):e233-40.
44. Iida S, Shimada J, Sakagami H. Cytotoxicity induced by docetaxel in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vivo*. 2013; 27(3): 321-32.
45. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [Web Page]. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [cited 2017 10/03/2017]. France: IARC/WHO; 2012. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
46. de Jesus GP, Ribeiro FA, de Moura CF, Gollucke AP, Oshima CT, Ribeiro DA. Anti-tumor activity of grape juice concentrate in the rat tongue two-stage initiation-promotion protocol induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24(4):276-83.
47. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians. Part 2: epidemiology. *Dent Update*. 2015;42(4):354-6, 8-9.
48. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 5: risk factors (other). *Dent Update*. 2015;42(8):766-8, 71-2, 75-6.
49. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 6: potentially malignant disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866-8, 71-4, 77.
50. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006; 42(7): 655-67.

51. Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(5): 467-71.
52. Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(10): 2849-54.
53. Krishnatreya M, Nandy P, Rahman T, Sharma JD, Das A, Kataki AC, et al. Characteristics of oral tongue and base of the tongue cancer: a hospital cancer registry based analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(4):1371-4.
54. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 987-93.
55. Lahlou S, Interaminense LF, Leal-Cardoso JH, Duarte GP. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17:323–30.
56. Lee KH, Chen YS, Judson JP, Chakravarthi S, Sim YM, Er HM. The effect of water extracts of *Euphorbia hirta* on cartilage degeneration in arthritic rats. *Malays J Pathol.* 2008;30(2):95-102.
57. Lim AY, Segarra I, Chakravarthi S, Akram S, Judson JP. Histopathology and biochemistry analysis of the interaction between sunitinib and paracetamol in mice. *BMC Pharmacol.* 2010; 10:14.
58. Lin HY, Thomas JL, Chen HW, Shen CM, Yang WJ, Lee MH. In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:941–51.
59. Long NK, Makita H, Yamashita T, Toida M, Kato K, Hatakeyama D, et al. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. *Oncol Rep.* 2007;17(4):879-85.
60. Loughlin R, Gilmore BF, McCarron PA, Tunney MM. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46(4):428-33.
61. Lubet RA, Clapper ML, McCormick DL, Pereira MA, Chang WC, Steele VE, et al. Chemopreventive efficacy of Targretin in rodent models of urinary bladder, colon/intestine, head and neck and mammary cancers. *Oncol Rep.* 2012;27(5):1400-6.
62. Maia-Joca RP, Joca HC, Ribeiro FJ, do Nascimento RV, Silva-Alves KS, Cruz JS, et al. Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. *Life Sci.* 2014;115(1-2):52-8.

63. Manaia EB, Kaminski RC, de Oliveira AG, Corrêa MA, Chiavacci LA. Multifunction hexagonal liquid-crystal containing modified surface TiO₂ nanoparticles and terpinen-4-ol for controlled release. *Int J Nanomedicine*. 2015; 22(10): 811-9.
64. McCormick DL, Phillips JM, Horn TL, Johnson WD, Steele VE, Lubet RA. Overexpression of cyclooxygenase-2 in rat oral cancers and prevention of oral carcinogenesis in rats by selective and nonselective COX inhibitors. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; 3(1): 73-81.
65. Mehdipour M, Taghavi Zenouz A, Mesgari Abbasi M, Mohajeri D, Damghani H, Helli S, et al. Evaluation of the effect of two systemic doses of HESA-A on prevention of induced tongue neoplasm in rats. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(4):218-24.
66. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Biomed Res Int*. 2015;2015:590470.
67. Mohan S, Thiagarajan K, Sundaramoorthy B, Gurung V, Barpande M, Agarwal S, et al. Alleviation of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oxidative stress by *Oroxylum indicum* (L.) leaf extract in albino Wistar rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:229.
68. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis*. 2006;6:158.
69. Monthrope Y, Shaw J. A 'natural' dermatitis: contact allergy to tea tree oil. *Univ Toronto Med J*. 2004; 82(1):59-60.
70. Murphy J, Berman DR, Edwards SP, Prisciandaro J, Eisbruch A, Ward BB. Squamous cell carcinoma of the tongue during pregnancy: a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 74(12): 2557-66.
71. Naoi K, Sunagawa N, Yoshida I, Morioka T, Nakashima M, Ishihara M. Enhancement of tongue carcinogenesis in Hras128 transgenic rats treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oncol Rep*. 2010; 23(2): 337-44.
72. Nardelli A, D'Hooghe E, Drieghe J, Dooms M, Goossens A. Allergic contact dermatitis from fragrance components in specific topical pharmaceutical products in Belgium. *Contact Dermatitis*. 2009;60(6):303-13.
73. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 24(1 Pt 1): 53-8.

74. Nóbrega FF, Salvadori MG, Masson CJ, Mello CF, Nascimento TS, Leal-Cardoso JH, et al. Monoterpenoid terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:703848.
75. Nolen RS. AVMA board approves Panel on Euthanasia report: updated guidelines cover more species and methods. *J Am Vet Med Assoc*. 2011; 239(10): 1269.
76. Nunoshiba T, Demple B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res*. 1993; 53(14): 3250-2.
77. Okuyemi OT, Piccirillo JF, Spitznagel E. TNM staging compared with a new clinicopathological model in predicting oral tongue squamous cell carcinoma survival. *Head Neck*. 2014;36(10):1481-9.
78. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*. 2011; 29(11):1488–94.
79. Peng X, Li W, Johnson WD, Torres KE, McCormick DL. Overexpression of lipocalins and pro-inflammatory chemokines and altered methylation of PTGS2 and APC2 in oral squamous cell carcinomas induced in rats by 4-nitroquinoline-1-oxide. *PLoS One*. 2015; 10(1): e0116285.
80. Pereira TS, de Sant'anna JR, Silva EL, Pinheiro AL, de Castro-Prado MA. In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(2):852-7.
81. Pianta TJ, Buckley NA, Peake PW, Endre ZH. Clinical use of biomarkers for toxicant-induced acute kidney injury. *Biomark Med*. 2013;7(3):441-56.
82. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of chemotherapy on head and neck cancer. *Lancet*. 2000; 355(9208): 949-55.
83. Piña-Zentella RM, Rosado JL, Gallegos-Corona MA, Madrigal-Pérez LA, García OP, Ramos-Gomez M. Lycopene improves diet-mediated recuperation in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Food*. 2016; 19(6): 607-14.
84. Pino JA, Marbot R, Fuentes V. Characterization of volatiles in bullock's heart (*Annona reticulata* L.) fruit cultivars from Cuba. *J Agric Food Chem*. 2003;51(13):3836-9.
85. Price KA, Cohen EE. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2012;13(1):35-46.
86. Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(9):1551-7.

87. Reid JM, Walden CA, Qin R, Ziegler KL, Haslam JL, Rajewski RA, et al. Phase 0 clinical chemoprevention trial of the Akt inhibitor SR13668. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(3):347-53.
88. Ribeiro FA, de Moura CF, Gollucke AP, Ferreira MS, Catharino RR, Aguiar O Jr, et al. Chemopreventive activity of apple extract following medium-term oral carcinogenesis assay induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):815-21.
89. Ribeiro FA, Peres RC, Oshima CT, Spolidorio LC, Maluf L S, Ribeiro DA. Antioxidant activity of apple extract protects against rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(7):532-7.
90. Saba NF, Haigentz M Jr, Vermorken JB, Strojan P, Bossi P, Rinaldo A, et al. Prevention of head and neck squamous cell carcinoma: removing the "chemo" from "chemoprevention". *Oral Oncol*. 2015;51(2):112-8.
91. Salama SM, Bilgen M, Al Rashdi AS, Abdulla MA. Efficacy of boesenbergia rotunda treatment against thioacetamide-induced liver cirrhosis in a rat model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 137083.
92. Santos-Silva AR, Carvalho Andrade MA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, Lopes MA. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(1):103-7.
93. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(11):1832-43.
94. Sciarronea D, Ragonesea C, Carnovalea C, Piperno A, Dugoa P, Dugoa G, et al. Evaluation of tea tree oil quality and ascaridole: A deep study by means of chiral and multi heart-cuts multidimensional gas chromatography system coupled to mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2010;1217(41):6422–7.
95. Shapira S, Pleban S, Kazanov D, Tirosh P, Arber N. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156540.
96. Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, Kitayama W, Endoh T, Sasaki Y, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide. *Cancer Res*. 2001; 61(4): 1451-6.
97. Shrotriya S, Agarwal R, Sclafani RA. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2015;815:333-48.

98. Shrotriya S, Tyagi A, Deep G, Orlicky DJ, Wisell J, Wang XJ, et al. Grape seed extract and resveratrol prevent 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral tumorigenesis in mice by modulating AMPK activation and associated biological responses. *Mol Carcinog.* 2015; 54(4): 291-300.
99. Shuvy M, Nyska A, Beeri R, Abedat S, Gal-Moscovici A, Rajamannan NM, et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63(4): 303-6.
100. Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, de Sousa DP. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:953451.
101. Stanko P, Poruban D, Mracna J, Holly D, Janicek B, Pinakova Z, et al. Squamous cell carcinoma and piercing of the tongue - a case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(4):329-31.
102. Sugimura T, Otake H, Matsushima T. Single strand scissions of DNA caused by a carcinogen, 4-hydroxylaminoquinoline 1-oxide. *Nature.* 1968;218(5139):392.
103. Sultana J, Bashar A, Molla MR. New management strategies of oral tongue cancer in Bangladesh. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014;13(4):394-400.
104. Sun Z, Guan X, Li N, Liu X, Chen X. Chemoprevention of oral cancer in animal models, and effect on leukoplakias in human patients with ZengShengPing, a mixture of medicinal herbs. *Oral Oncol.* 2010; 46(2): 105-10.
105. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2003;4(4):319-26.
106. Suzuki R, Kohno H, Suzui M, Yoshimi N, Tsuda H, Wakabayashi K, et al. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis.* 2006; 27(3): 619-30.
107. Tada M, Tada M. Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature.* 1975;255(5508):510-2.
108. Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Yamada Y, Hirose Y, Sugie S, et al. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2002; 23(8): 1361-7.
109. Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Shirakami Y, Mori T, Watanabe N, et al. Apc-Mutant Kyoto Apc Delta (KAD) rats are susceptible to 4-NQO-induced tongue carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1522-39.

110. Titcomb CP Jr. Liver function tests: what is the risk? *J Insur Med.* 2003;35(1):26-35.
111. Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol.* 2015;44(1):169-85.
112. U.S. Census Bureau - World POPClock Projection. [Web Page]. U.S. Department of Commerce [Updated: The number on this page is automatically updated daily. Cited 2014 17/07/2014]. Available from: <http://www.census.gov/population/popclockworld.html>.
113. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63(5):1934-43.
114. Viswanadha VP, Sivan S, Rajendra Shenoi R. Protective effect of Spirulina against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. *Mol Biol Rep.* 2011;38(1):309-17.
115. Vizzotto Junior AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab.* 2003; 39(2): 143-9.
116. Wallenius K, Lekholm U. Oral Cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy.* 1973; 24(1): 39-48.
117. William WN Jr, Papadimitrakopoulou VA. Optimizing biomarkers and endpoints in oral cancer chemoprevention trials. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013;6(5):375-8.
118. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:818261.
119. Yanaida Y, Kohno H, Yoshida K, Hirose Y, Yamada Y, Mori H, et al. Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):787-94.
120. Yang C, Zhou LL, Wang HY, Huang SN, Liu Q, Hu SL, et al. The inhibitory effect of Zingiber corallinum Hance essential oil on drug-resistant bacteria and evaluation of its acute toxicity. *Med Sci Monit.* 2011;17(5):BR139-46.
121. Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, et al. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 2005;221(1):29-39.

122. Zhao J, Wang Z, Han J, Qiu X, Pan J, Chen J. Increased frequency of CD4+ CD25+ FOXP3+ cells correlates with the progression of 4-nitroquinoline1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(7): 1725-30.
123. Zhou G, Hasina R, Wroblewski K, Mankame TP, Doçi CL, Lingen MW. Dual inhibition of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor is an effective chemopreventive strategy in the mouse 4-NQO model of oral carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(11):1493-502.