

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de 08/09/2024



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



Caroline Camizotti Guerra

**Candida albicans e Staphylococcus sp identificam a presença de carcinoma
espinocelular invasivo e invasivo profundo induzido por óxido de 4-
nitroquilolína**

Araraquara

2022



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



Caroline Camizotti Guerra

**Candida albicans e Staphylococcus sp identificam a presença de carcinoma
espinocelular invasivo e invasivo profundo induzido por óxido de 4-
nitroquilolína**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Cirurgia e Diagnóstico.

Orientador: Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2022

G929c

Guera, Caroline Camizotti

Candida albicans e Staphylococcus sp identificam a presença de carcinoma espinocelular invasivo e invasivo profundo induzido por óxido de 4-nitroquilolona / Caroline Camizotti Guera. -- Araraquara, 2022
41 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Cleverton Roberto de Andrade

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Candida albicans. 3. Staphylococcus. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Caroline Camizotti Guerra

**Candida albicans e Staphylococcus sp identificam a presença de carcinoma
espinocelular invasivo e invasivo profundo induzido por óxido de 4-
nitroquilolina**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências odontológicas

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

2º Examinadora: Prof.^a Dr.^a Andreia Bufalino

3º Examinador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Araraquara, 08 de setembro de 2022.

DADOS CURRICULARES

Caroline Camizotti Guerra

NASCIMENTO: 13/09/1995 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Andreia Lima Camizotti

Gerson Luiz Guerra

2014/2019: Curso de graduação em odontologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

2018/2018: Curso de Atualização em Cirurgia Oral Menor

Associação Brasileira de Odontologia – ABO

2019/2019: Curso de Aperfeiçoamento em Estomatologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

2020/2022: Mestrado em Ciências Odontológicas

Universidade Estadual Paulista – UNESP

AGRADECIMENTOS

À minha família,

que esteve comigo durante todo o processo, me suportando em todos os momentos e, principalmente, nos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade,

pelo comprometimento e auxílio ao longo desses mais de 2 anos de projeto, fazendo com que fosse possível chegar até aqui.

Ao departamento de Diagnóstico e Cirurgia,

Pelo acolhimento, carinho e ajuda nessa etapa da minha vida.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (132341/2020-4), pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa e desenvolvimento do projeto.

Guerra CC. *Candida albicans* e *Staphylococcus* sp identificam a presença de carcinoma espinocelular invasivo e invasivo profundo induzido por óxido de 4-nitroquilolina [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral soma 90 a 95 por cento dos cânceres orais e a incidência descreve homens com idade entre 40 e 60 anos. O maior fator de risco é o uso de tabaco e álcool, sendo descritos em ação independente ou combinada. O método padrão-ouro para o diagnóstico de CEC continua sendo a biópsia e o exame histopatológico. Coloração vital, sistemas de detecção baseados em luz, autofluorescência, técnicas citológicas, análise molecular, diagnóstico por imagem, onco-chips foram descritos para obter o diagnóstico precoce. O objetivo deste estudo foi verificar a correlação do pool de microrganismos, pool de bactérias, *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* e a presença de CEC em ratos induzidos por câncer 4-NQO. Métodos: A saliva dos ratos foi coletada um dia antes do sacrifício dos animais. A língua foi suavemente raspada com um cotonete enquanto o camundongo estava imobilizado. Um frasco Eppendorf contendo 1 mL de PBS foi agitado em vórtex por 2 minutos e uma diluição seriada decimal foi realizada para ser semeada em meio de cultura seletivo para *Streptococcus* sp (ágar mitis salivarius, *staphylococcus* (ágar hipertônico de gema de ovo), e para *enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (saboroud dextrose) Após o crescimento dos microrganismos foi identificado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e realizada a transformação log10 para análise estatística Resultados: Na análise microbiológica, para o grupo de ratos saudáveis, apenas o grupo *Staphylococcus* sp obteve diferença estatística. Houve o aumento desse microrganismo em relação ao controle. Quanto ao grupo de animais induzidos ao câncer oral, pool de microrganismo, pool de bactéria e *enterococcus faecalis*, obteve-se uma redução em relação ao controle. Já na análise histopatológica podemos observar uma correlação positiva entre CEC invasivo e pool de microrganismos, bactéria, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Enterococcus faecalis*, para o grupo 4-NQO. No entanto, para esses mesmos microrganismos observamos correlação negativa com CEC invasivo, para os grupos induzidos ao câncer oral, porém tratados com TP4ol (0,1nL/g e 8nL/g). Acreditamos que o pool de microrganismos, pool de bactérias, *Candida albicans* e *Staphylococcus* sp são preditivos da presença de CEC invasivo.

Palavras – chave: Carcinoma de Células Escamosas. *Candida albicans*. *Staphylococcus*.

Guerra CC. *Candida albicans* and *Staphylococcus* sp identify the presence of invasive and deep invasive squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline oxide [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) sum 90 to 95 percent of oral cancers and the incidence described men aged 40 to 60 years old. The greater risk factor is the use of tobacco and alcohol, and they are described in independent or combined action. The gold standard method for OSCC diagnosis remain biopsy and histopathological examination. Vital staining, light-based detection systems, auto fluorescence, cytological techniques, molecular analysis, imaging diagnostic, onco-chips were described to obtain early diagnosis. The aim of this study was verifying the correlation of pool of microorganisms, a pool of bacteria, *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis*, and *Candida albicans* and the presence of OSCC in 4-NQO cancer-induced rats. Methods: The rats' saliva was collected one day before the sacrifice of animals. The tongue was gently scraped with a swab while the mouse was immobilized. An Eppendorf vial containing 1 mL of PBS was vortex for 2 minutes and a decimal serial dilution was realized to be plated in selective culture media for streptococcus sp (agar mitis salivarius, staphylococcus (hypertonic egg yolk agar), and for enterococcus faecalis and *Candida albicans* (saboroud dextrose). After microorganisms' growth, the number of colony-forming units (CFU/mL) was identified and a log₁₀ transformation was realized to perform statistical analysis. Results: In the microbiological analysis, for the group of healthy rats, only the *Staphylococcus* sp group obtained a statistical difference. There was an increase of this microorganism in relation to the control. As for the group of animals induced to oral cancer, pool of microorganism, pool of bacteria and enterococcus faecalis, there was a reduction in relation to the control. In the histopathological analysis, we can observe a positive correlation between invasive SCC and pool of microorganisms, bacteria, *Streptococcus* so, *Staphylococcus* sp and *Enterococcus faecalis*, for the 4-NQO group. However, for these same microorganisms, we observed a negative correlation with invasive SCC, for the groups induced to oral cancer, but treated with TP4ol (0.1nL/g and 8nL/g). We believe that the pool of microorganisms, pool of bacteria, *Candida albicans* and *Staphylococcus* sp are predictive of the presence of invasive SCC.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell. *Candida albicans*. *Staphylococcus*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Carcinoma Espinocelular	12
3.2 Microrganismos e o Câncer Bucal	13
3.3 Terpinen-4-ol (TP-4-ol)	14
3.4 Óxido de 4-Nitroquinolina.....	15
4 MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 Animais	17
4.2 4-NQO Indução de Câncer.....	17
4.3 Tratamento com Terpinen-4-ol.....	17
4.4 Design Experimental.....	17
4.5 Coleta de Amostras Clínicas.....	17
4.6 Análise Histopatológica.....	18
4.7 Análise Estatística.....	20
5 RESULTADO	21
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
ANEXO A	41

1 INTRODUÇÃO

A população humana mundial estimada é de cerca de 7,9 bilhões de habitantes¹ e o câncer é a principal causa de morbidade e mortalidade². A cabeça e pescoço apresentam cerca de 780.000 novos tumores malignos anualmente levando a 500.000 óbitos³. No Brasil, o câncer de cavidade oral é um dos dez tumores malignos mais comuns com 14.000 casos anuais entre 2020-2022. De fato, o Brasil apresenta o câncer de cavidade oral como o quinto tumor maligno mais comum em homens (11.200, 2022) que juntando tem a maior prevalência relativa de câncer bucal do mundo³. O método padrão-ouro para o diagnóstico de CEC continua sendo a biópsia e o exame histopatológico. Coloração vital, sistemas de detecção baseados em luz, autofluorescência, técnicas citológicas, análise molecular, diagnóstico por imagem, onco-chips foram descritos para obter o diagnóstico precoce⁴.

O carcinoma de células escamosas oral (CEC) é responsável por 90-95 por cento dos cânceres orais. Surgem principalmente em homens na quinta e sétima década de vida. Nenhum fator etiológico isolado é claro de início do CEC⁵, mas o tabaco e o álcool associado ao tabaco são os fatores mais significativos⁶⁻⁸. Fumantes apresentam 16 vezes mais chance de CEC do que não fumantes⁹, e o álcool atua em sinergia com o tabaco. Cerca de 75% dos pacientes com CEC são aditivos de álcool ou consumidores crônicos de álcool. A associação tabaco/álcool aumentou o risco de CEC em 100 vezes^{9,10}.

Embora os microrganismos orais sejam capazes de regular positivamente os mediadores inflamatórios que podem estar envolvidos na carcinogênese, os microrganismos orais suplementares mostraram-se aptos a metabolizar álcool em acetaldeído ou catalisar a biotransformação de compostos N-nitrosos em nitrito e aminas, amidas ou outros nitrosáveis. Esses compostos têm sido implicados na transformação oncogênica celular, principalmente em pacientes com câncer bucal que bebem muito, fumam e apresentam problemas de saúde bucal^{11,13}.

A microbiota do CEC mostrou prevalência de *Streptococcus anginosus*¹⁴⁻¹⁷, *Streptococcus mitis*, *Capnocytophaga gingivalis*^{15,16}, *Prevotella melaninogenica*¹⁵⁻¹⁷, *Helicobacter pylori*¹⁸⁻²⁰, *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Veillonella parvula*, *Staphylococcus aureus*¹⁵, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides nucleatum*^{21,22}, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Haemophilus* e *Enterobacteriaceae* sp e *Streptococcus* spp¹⁷. O grau de câncer mostrou uma correlação direta com a infecção do

microrganismo²² que poderia advir possível biomarcador de progressão maligna associado a potenciais lesões malignas e tumores precoces e metastáticos^{11,15,23,24}.

De fato, o uso potencial de agentes naturais foi descrito impactando no início, promoção e progressão de lesões potencialmente malignas e malignas^{27,29}. O terpinen-4-ol (TP-4-ol), tem sido associado a antibacteriano³²⁻³⁴, antifúngico³⁵, antiparasitário³⁶, antiviral³⁷, relaxante da musculatura lisa vascular³⁸, hipotensor³⁹, anticonvulsivante⁴⁰, anti-inflamatório⁴¹, antioxidante⁴², quimiopreventivo do câncer^{43,44}. Recentemente, realizamos experimento de câncer induzido por óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) para verificar a eficácia de inibição de Terpene-4-ol (TP-4-ol) decorrente de câncer de língua oral que é semelhante a outros quimioterápicos de estudos preventivos^{27,28}.

O monoterpene (TP-4-ol) apresenta dois estereoisômeros. Esses isômeros ópticos são (-)-Terpinen-4-ol [(R)-p-Menth-1-en-4-ol, (R)-1-Isopropil-4-metil-3-ciclohexen-1-ol] e (+)-Terpinen-4-ol [(S)-p-Ment-1-en-4-ol, (S)-1-Isopropil-4-metil-3-ciclo-hexen-1-ol]⁴⁵. Resultados anteriores relataram efeito antimicrobiano do TP-4-ol, porém, não foram descritos no isômero óptico¹³⁻²². Nosso grupo descreveu a atividade antineoplásica do isômero negativo TP-4-ol [(-)-Terpinen-4-ol] no carcinoma espinocelular oral.

O óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) é um hidrocarboneto aromático policíclico útil para induzir o carcinoma espinocelular (CEC) de língua desde as décadas de 1960⁵¹ e 1970⁵². A bebida oral 4NQO tem sido usada para induzir câncer de língua com estágios sequenciais semelhantes da carcinogênese oral humana (molecular e histológica)⁵³.

A descrição da microbiota do uso crônico do TP4ol não foi descrita para camundongos 4NQO saudáveis ou com câncer bucal e esses dados serão úteis para estabelecer estudo eventual associação da microbiota e CEC decorrente. Por outro lado, será útil diagnosticar a presença de CEC precoce ou invasivo de forma não invasiva. Da mesma forma, seria útil para diagnosticar potenciais lesões malignas em modelo de rato induzido por câncer 4QNO preventivo de quimioterapia.

7 CONCLUSÃO

O grupo saudável apresenta aumento de *Staphylococcus* sp tratado com 0,1nL/g de Terpinen-4-ol ($P<0,01$). Uma exposição crônica da droga pode ter causado uma resistência dos microrganismos selecionados e, nossos dados descreveram isso na menor concentração de TP-4-ol.

Nossa gavagem oral de Terpinen-4-ol (8nL/g, TP-4-ol[-]) em uso crônico reduziu o pool de microbiota oral ($P<0,05$) e o pool de bactérias ($P<0,05$) em ratos induzidos por 4-NQO, e o *Enterococcus faecalis* é a espécie que apresenta essa redução ($P<0,05$).

Acreditamos que o pool de microrganismos (0,87), pool de bactérias (0,78), *Candida albicans* (0,78) e *Estafilococcus* sp (0,70) são preditivos da presença de CEC invasivo e *Estafilococcus* sp é preditivo da presença de displasia moderada em ratos induzidos com 4-NQO.

Esses resultados sugerem a possibilidade de utilização de análises desses microrganismos como um marcador útil para identificar a presença de câncer em um modelo 4-NQO. Porém, ainda são necessários mais estudos sobre microrganismos envolvidos na progressão do câncer em ratos.

REFERÊNCIAS

1. U.S.Census Bureau: World POPClock Projection [Web Page]. Washington, DC: Department of Commerce; 2020 [acesso em 2021 10 nov.]. Disponível em: <http://www.census.gov/population/popclockworld.html>.
2. 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.
3. Global Cancer Observatory [Web Page]. International Agency for Research on Cancer: World Health Organization; 2020; [acesso em 2021 10 nov]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>.
4. Carreras-Torras C, Gay-Escoda C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May 1;20(3):305-15
5. M. Braakhuis, C. Rene´ Leemans, and Ruud H. Brakenhoff. A Genetic Progression Model of Oral Cancer : Current Evidence and Clinical Implications. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33: 317–22.
6. Warnakulasuriya, Saman. Global Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancer. *Oral Oncology* 45 (4–5). 2009; 309–16.
7. La Vecchia C, A Tavani, S Franceschi, F Levi, G Corrao, and E Negri. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. *Oral Oncology*. 1997; 33 (5): 302–12.
8. Lewin F, S E Norell, H Johansson, P Gustavsson, J Wennerberg, A Biörklund, and L E Rutqvist. Smoking Tobacco, Oral Snuff, and Alcohol in the Etiology of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Population-Based Case-Referent Study in Sweden. *Cancer*. 1998; 82 (7): 1367–75.
9. Liang, Xin-Hua, Jason Lewis, Robert Foote, David Smith, and Deepak Kademani. Prevalence and Significance of Human Papillomavirus in Oral Tongue Cancer: The Mayo Clinic Experience. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2008;66 (9): 1875–80.
10. Nemoto RP, Victorino AA, Pessoa GB, Cunha LLG, Silva JAR, Kanda JL, et al. Oral cancer preventive campaigns: are we reaching the real target? *Braz Othorinolaryngol*. 2015; 81(1): 44-9.
11. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral cancer. *Dent Clin N Am*. 2014; 58(2): 315-40.
12. Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol*. 2010; 10 (2): 1-10.
13. Rajeev R, Choudhary K, Panda S, Gandhi N. Role of bacteria in oral carcinogenesis. *South Asian J Cancer*. 2012;1:78-83.
14. Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from-secondary amines by E. coli strains. *Carcinogenesis* 1985;6:911-5 8: 245-8.

15. Sasaki M, Yamaura C, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T, et al. Streptococcus anginosus infection in oral cancer and its infection route. *Oral Diseases* 2005;11:151-6.
16. Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2010;31:126-31.
17. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med.* 2005, 7;3:27.
18. Nagy K, Sonkodi I, Szoke I, et al. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol.* 1998; 34: 304–8.
19. Anand D, Vineeta S, Mridula S, Royana S, Manoj P. Helicobacter pylori and oral cancer: possible association in a preliminary case control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12:1333-6.
20. Fernando N, Jayakumar G, Perera N, Amarasingha I, Meedin F, Holton J. Presence of Helicobacter pylori in betel chewers and non betel chewers with and without oral cancers. *BMC Oral Health* 2009;9:23.
21. Rajendran R, Rajeev R, Anil S, Alasqah M, Rabi AG. Helicobacter pylori coinfection is a confounder, modulating mucosal inflammation in oral submucous fibrosis. *Indian J Dent Res* 2009;20:206-11.
22. Tateda M, Shiga K, Saijo S, Sone M, Hori T, Yokoyama J, et al. Streptococcus anginosus in head and neck squamous cell carcinoma: Implication in carcinogenesis. *Int J Mol Med.* 2000;6:699-703.
23. Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000; 36: 272-6.
24. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, Huey B, Corby PM, Queiroz EL, Nightingale K, Kerr AR, DeLacure MD et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One.* 2014;9(8):e106297.
25. Wang L, Ganly I. The oral microbiome and oral cancer. *Clin Lab Med.* 2014; 34(4): 711-9.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. William WN Jr, Papadimitrakopoulou VA. Optimizing biomarkers and endpoints in oral cancer chemoprevention trials. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013;6(5):375-8.

30. 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.
31. de Groot AC, Schmidt E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis.* 2016;75(3):129-43.
32. 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.
33. Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Różalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol.* 2011;60(1):35-41.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. 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
47. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19:
48. Salén JCW. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kesel ML. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. 3ed. Boston: CRC Press; 1995.
49. Lynette AH. *Responsible conduct with animals in research*. England: Oxford Univ. Press; 1998.
50. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):301–13.
51. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006; 42(7): 655-67.
52. Fujino H, Chino T, Imai T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *Journal of the National Cancer Institute*. 1965; 35(6): 907-18.
53. Wallenius K, Lekholm U. Oral Cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontologisk Revy*. 1973; 24: 39-47.
54. 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.
55. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras*. 2004;19(4):441-7.
56. Gaetti-Jarfim, E. C. et al. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. *Revista Odontológica de Araçatuba, Araçatuba*, v. 31, n. 2, p.09- 13, dezembro, 2010.
57. Gupta, K.; Metegurd, R. Evidences Suggesting Involvement of Viruses in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology Research International, India*, v. 7, n. 4, p.321- 332, out. 2013.
58. Antunes AA, Antunes AP, Silva PV, Avelar RL, Santos TS. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2007;36(3):152-4.
59. Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866-8, 871-4, 877.

60. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 5: risk factors (other). *Dent Update*. 2015;42(8):766-8, 71-2, 75-6.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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
65. 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.
66. 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.
67. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 6: potentially malignant disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866-8, 71-4, 77.
68. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014; 27;10(3):e1003933.
69. Yamamoto V, Gacek RRF. Microbiota oral de ratos e camundongos: estudo da prevalência de bactérias gram positivas. *RESBCAL*. 2012; 1(4): 302-309.
70. Porto SMMS, Viana MT, Silva KMF, Diniz MFA, Castro CMMB. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. *Rev. Nutr*. 2007; 20 (6): 625-632.
71. 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.
72. 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.
74. Borotová P, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Tvrdá E, Kačániová M. Chemical and Biological Characterization of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. *Plants (Basel)*. 2022 Feb 20;11(4):558.
75. Bordini EAF, Tonon CC, Francisconi RS, Magalhães FAC, Huacho PMM, Bedran TL, Pratavieira S, Spolidorio LC, Spolidorio DP. Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression. *Biofouling*. 2018 Aug;34(7):815-825.

76. Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, Francisconi RS, Bordini EAF, Marcantonio É, Spolidorio DMP. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. *Biofouling*. 2018 Jul;34(6):699-709.
77. Maquera Huacho PM, Rodriguez Herrero E, Verspecht T, Pauwels M, Marcantonio E Jr, Palomari Spolidorio DM, Teughels W. Terpinen-4-ol and carvacrol affect multi-species biofilm composition. *Biofouling*. 2019 May;35(5):561-572.
78. Cordeiro L, Figueiredo P, Souza H, Sousa A, Andrade-Júnior F, Medeiros D, Nóbrega J, Silva D, Martins E, Barbosa-Filho J, Lima E. Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 25;21(12):4531.
79. Bose, S. K., M. Chauhan, N. Dhingra, S. Chhibber and K. Harjai (2020). "Terpinen-4-ol attenuates quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*." *Future Microbiol* 15: 127-142.
80. de Fátima Souto Maior L, Maciel PP, Ferreira VaYN, de Lima Gouveia Dantas C, de Lima JM, Castellano LRC, Batista AUD, Bonan PRF. Antifungal activity and Shore A hardness of a tissue conditioner incorporated with terpinen-4-ol and cinnamaldehyde. *Clin Oral Investig*. 2019 Jul;23(7):2837-2848.
81. Hammer KA, Heel KA. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Sep;40(3):239-45.
82. Guo N, Zhou LX, Meng N, Shi YP. Associations of oral and intestinal floras and serum inflammatory factors with pathogenesis of oral cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Nov;24(21):11090-11095.
83. Anjali K, Arun AB, Bastian TS, Parthiban R, Selvamani M, Adarsh H. Oral microbial profile in oral cancer patients before and after radiation therapy in a cancer care center - A prospective study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020 Jan-Apr;24(1):117-124.
84. Engku Nasrullah Satiman EAF, Ahmad H, Ramzi AB, Abdul Wahab R, Kaderi MA, Wan Harun WHA, Dashper S, McCullough M, Arzmi MH. The role of *Candida albicans* candidalysin ECE1 gene in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2020 Oct;49(9):835-841.
85. Vadovics M, Ho J, Igaz N, Alföldi R, Rakk D, Veres É, Szücs B, Horváth M, Tóth R, Szücs A, Csibi A, Horváth P, Tiszlavicz L, Vágvolgyi C, Nosanchuk JD, Szekeres A, Kiricsi M, Henley-Smith R, Moyes DL, Thavaraj S, Brown R, Puskás LG, Naglik JR, Gácsér A. *Candida albicans* Enhances the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma *In Vitro* and *In Vivo*. *mBio*. 2022 Jan 4;13(1):e0314421.
86. Dwivedi PP, Mallya S, Dongari-Bagtzoglou A. A novel immunocompetent murine model for *Candida albicans*-promoted oral epithelial dysplasia. *Med Mycol*. 2009 Mar;47(2):157-67.

87. Wang Y, Liu S, Li B, Jiang Y, Zhou X, Chen J, Li M, Ren B, Peng X, Zhou X, Cheng L. Staphylococcus aureus induces COX-2-dependent proliferation and malignant transformation in oral keratinocytes. J Oral Microbiol. 2019 Jul 22;11(1):1643205.