



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 – Candeal – 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, hepatopathies and nephropathies 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 desoxirribonucleico

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.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de Língua

Atualmente, a população mundial é estimada em 7.164.876.710 habitantes (U.S. Census Bureau¹¹², 2014) e o câncer caminha para se tornar a principal causa de morbidade e mortalidade (Bray et al.¹², 2012). Na região de cabeça e pescoço, os CEC de cavidade oral e lábio atingiram mais de 300.000 casos, com mais de 50% de óbitos. Neste contexto, o Brasil apresenta maiores taxas relativas de prevalências do CEC oral em relação ao mundo, com taxa de 2,4%, enquanto os dados mundiais relatam taxa de 2,2% (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization⁴⁵, 2012).

Além do CEC oral, contribuir para a manutenção dos carcinomas como principal causa de morte no mundo (Sobral et al.¹⁰⁰, 2014), recentemente, ainda foi observado aumento da incidência de CEC de língua em jovens brancos com menos de 44 anos (Patel et al.⁷⁸, 2011; Toporcov et al.¹¹¹, 2015). Os estudos demonstram possível associação a novos hábitos como o uso de piercing em homens relacionado a corrosão do níquel e do cromo (Stanko et al.¹⁰¹, 2012), mas também ao sexo oral sem preservativo, associado ao maior risco de contágio do papiloma vírus humano (HPV) dos tipos 16 (90%), 18, 31 e 33 em mulheres não imunizadas contra o HPV (Kalavrezos, Scully⁴⁸, 2015) ou ao gênero, como é o caso de mulheres não tabagistas ou etilistas associado a história familiar de câncer ou a baixa ingestão de frutas e vegetais (Patel et al.⁷⁸, 2011; Toporcov et al.¹¹¹, 2015)

As características clínicas do carcinoma de língua envolvem lesões ulceradas únicas com bordas endurecidas que se mantêm por duas ou quatro semanas após a eliminação do possível fator de risco ou outro tratamento instituído (Kalavrezos, Scully⁴⁹, 2015), úlcera infiltrativa dolorosa (Santos-Silva et al.⁹², 2014; Stanko et al.¹⁰¹, 2012), eritroleucoplasia (Murphy et al.⁷⁰, 2016; Santos-Silva et al.⁹², 2014), eritroplasia, leucoplasia não-homogênia (eritroleucoplásica, nodular ou verrucosa), líquen plano erosivo e lesões líquenóides (Kalavrezos, Scully⁴⁹, 2015).

As principais localizações do carcinoma de língua são a base e a borda lateral, regiões de difícil acesso e visualização em métodos de rastreamento e detecção precoce, o que colabora para o diagnóstico tardio da doença (He et al.⁴⁰,

2016; Kalavrezos, Scully⁴⁷, 2015; Murphy et al.⁷⁰, 2016; Patel et al.⁷⁸, 2011; Santos-Silva et al.⁹², 2014; Stanko et al.¹⁰¹, 2012).

Em 80% dos casos de carcinoma de língua, os diagnósticos são realizados em pacientes em estádios III e IV, os quais apresentam risco até 3,3 vezes maior de apresentarem metástases em linfonodos e pulmões (Krishnatreya et al.⁵³, 2015).

As análises histopatológicas das biópsias de carcinoma de língua descrevem áreas de displasia grave ou carcinoma (Kalavrezos, Scully⁴⁹, 2015) com proliferação intensa de células epiteliais, mitoses atípicas, disqueratoses, assim como ninhos e cordões de células epiteliais hipercromáticas e pleomórficas atípicas invadindo o tecido conjuntivo e fibras musculares, além da presença de áreas de necrose (Santos-Silva et al.⁹², 2014).

É importante salientar que as modalidades de tratamento do carcinoma de língua são indicadas de acordo com o estágio do tumor primário, da presença de nódulo linfático e metástase (TNM), associados ao grau de comorbidade, extensão extracapsular e invasão vascular, resultando no prognóstico do paciente (Okuyemi et al.⁷⁷, 2014).

O tratamento do carcinoma de língua nos estádios I e II, pacientes de baixo risco de óbito, sem invasão muscular ou linfovascular (Huang, O'Sullivan⁴³, 2013) envolve radioterapia curativa ou glossectomia parcial mais radioterapia adjuvante (Santos-Silva et al.⁹², 2014; Sultana et al.¹⁰³, 2014) e/ou quimioterapia citotóxica (Sultana et al.¹⁰³, 2014) associados ao esvaziamento cervical dos gânglios supra-omo-hióideo homolateral e reconstrução miocutânea proveniente de um retalho no bíceps (Santos-Silva et al.⁹², 2014).

Nos estádios III e IV, pacientes de risco intermediário (invasão perineural ou linfovascular) e de alto risco de óbito (invasão extra-capsular) (Huang, O'Sullivan⁴³, 2013) envolve hemiglossectomia ou glossectomia subtotal associada ao esvaziamento cervical dos gânglios supra-omo-hióideos bilaterais mais radioterapia pós-operatória e quimioterapia paliativa (Santos-Silva et al.⁹², 2014; Sultana et al.¹⁰³, 2014) e/ou citotóxica (Sultana et al.¹⁰³, 2014).

De fato, o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (CCP) em estádios avançados apresenta-se complexo e de alto custo, necessitando de abordagem multidisciplinar, muitas vezes associando tratamento quimioterápico, ao contrário dos estádios iniciais que requerem, frequentemente, uma única modalidade de tratamento gerando menor custo. Infelizmente, o alto custo do tratamento tem pouca

influência sobre a taxa de sobrevida ou a qualidade de vida dos pacientes (Divi et al.²¹, 2016).

Especificamente falando das principais drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento do carcinoma de língua, encontramos uma combinação de cisplatina, 5-fluorouracil, bleomicina, carboplatina e ifosfamida, derivadas de produtos sintéticos, além do paclitaxel (Sultana et al.¹⁰³, 2014) e docetaxel, derivados de produtos naturais, estes últimos usados para potencializar o tratamento de casos com metástase ou recorrência do CCP (Price, Cohen⁸⁵, 2012).

A via de administração oral é muito utilizada nos tratamentos quimioterápicos, por apresentar efetividade e especificidade no controle do crescimento e progressão do câncer (Carrington¹⁶, 2015). Além disso, dos novos medicamentos oncológicos recém desenvolvidos, 35% são agentes quimioterápicos orais (Finn et al.²⁶, 2016).

A administração quimioterápica oral apresenta as seguintes vantagens: possibilidade de tratamento domiciliar; reduzidas visitas ao hospital; conciliação do tratamento com a jornada de trabalho; eliminação da dor proveniente da administração IV; ausência de contra-indicação associado à administração IV isolada ou combinada; percepção da eficácia do tratamento pelo paciente; menores efeitos colaterais; autonomia do paciente nos cuidados oncológicos; menor impacto sobre a vida diária e familiar com o aumento da qualidade de vida (Eek et al.²³, 2016). Entretanto, apresenta as seguintes desvantagens: menor adesão ao tratamento; maior custo dos medicamentos; menor controle de associação com outras drogas propiciando maior possibilidade de interações medicamentosas; e maior tempo no diagnóstico de possíveis efeitos adversos (Finn et al.²⁶, 2016).

O diagnóstico precoce dos CCP, utilizando biomarcadores como a citologia esfoliativa para identificação dos microRNA-21 e 375 pode propiciar o diagnóstico precoce de lesões primárias ou mesmo de recidivas do tumor (He et al.⁴⁰, 2016) embora também permita diagnosticar lesões mais avançadas e agressivas.

Quanto a taxa de sobrevida em 5 anos, considerando a localização do carcinoma de língua, observam-se diferenças importantes entre pacientes diagnosticados com tumores nos dois terços anteriores demonstrando taxa de sobrevida de 78% e no terço posterior de 61% (Garzino-Demo et al.³³, 2016).

Também observam-se diferenças de gênero, mulheres (55%) apresentam melhor prognóstico que homens (45%) (Kalavrezos; Scully⁴⁵, 2015). Além disso, outros fatores demonstram importância na formação dos prognósticos de pacientes

com carcinoma lingual, tais como: a idade, o comprometimento de linfonodos, a disseminação extracapsular, o grau histológico do tumor, a presença de invasão perineural, a profundidade de infiltração e a invasão da medula óssea (Garzino-Demo et al.³³, 2016).

2.2 Carcinogênese Lingual e Citotoxicidade Renal e Hepática em Animais induzidos pelo Óxido de 4-Nitroquinolina

O 4-NQO é uma substância carcinogênica do grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sendo considerada a melhor substância disponível para as produções de carcinogênese oral (Kanojia, Vaidya⁵⁰, 2006), mas também pode propiciar citotoxicidade renal e hepática (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

O metabolismo do 4-NQO no fígado é iniciado pela redução enzimática do grupo nitro, formando óxido de 4-hidroxiaminoquinolina que produz adutos no ácido desoxirribonucleico (DNA), que é especificamente carcinogênico pela produção do composto quilona. O DNA, quando metabolizado, em 8-hidroxi-desoxiguanosina causa danos oxidativos em vários órgãos, tais como fígado e rins (Arima et al.⁴, 2006; Mohan et al.⁶⁷, 2016; Nunoshiba, Demple⁷⁶, 1993).

Sua ação carcinogênica foi associada à indução de mutações em bases nitrogenadas do DNA, deleções e conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (Tanaka et al.¹⁰⁸, 2002). O seu uso em modelos de carcinogênese experimental teve início na década de 1960 e 1970 (Fujino et al.²⁹, 1965; Sugimura et al.¹⁰², 1968; Wallenius, Lekholm¹¹⁶, 1973), e como modelo de citotoxicidade renal e hepática, na década de 2000 (Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

O 4-NQO pode ser administrado por via oral, na água de beber, sendo de fácil aplicação. Este modelo é amplamente explorado por apresentar alta efetividade carcinogênica e grande semelhança com o processo de carcinogênese humana. A droga é capaz de induzir a formação carcinogênica em estágios seqüenciais, mimetizando alterações histológicas e moleculares que ocorrem em humanos, resultando em tumores diferenciados (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Sun et al.¹⁰⁴, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

O modelo também permite controlar as condições experimentais, garantindo reprodutibilidade, com reduzidas variações. Isto permite intervenções em diferentes estágios do processo de carcinogênese, como exemplo, durante a fase de progressão dos tumores. De fato, é possível identificar lesões com potencial de malignização e malignas, assim como analisar possíveis efeitos renais e hepáticos associados ao tratamento e/ou ao 4-NQO (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Sun et al.¹⁰⁴, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

2.3 Quimioprevenção de Carcinogênese Lingual

Atualmente, novas terapias utilizando quimioterápicos mais eficazes, novos métodos de radioterapia, terapia-alvo específica, terapia genética, terapia biológica e quimioprevenção utilizando compostos naturais, apresentam-se como uma possível terapia para propiciar melhora no tratamento de pacientes com CCP (Mehdipour et al.⁶⁵, 2013).

A quimioprevenção visa controlar, regredir ou interromper os estágios de iniciação, promoção ou progressão de lesões com potencial de malignização ou malignas, muitas vezes utilizando agentes naturais ou sintéticos, os quais são denominados de agentes quimiopreventivos ou quimioprotetores (Saba et al.⁹⁰, 2015; Shrotriya et al.⁹⁷, 2015). Sua aplicação poder ser realizada em modelos pré-clínicos ou clínicos.

O modelo ideal para estudo de agentes quimiopreventivos contra o câncer é aquele que possibilita avaliar a resposta da intervenção preventiva por meio do monitoramento clínico, histológico e molecular da lesão (William, Papadimitrakopoulou¹¹⁷, 2013)

O modelo de quimioprevenção utilizando o 4-NQO apresenta alta reprodutibilidade e permite avaliar a eficácia e a toxicidade de uma substância, composto ou droga (Zhou et al.¹²³, 2010).

Compostos de origens naturais têm propiciado o desenvolvimento de muitas drogas para o tratamento do câncer (Bundela et al.¹⁴, 2015). Por este motivo, frequentemente estudos tentam identificar novas drogas considerando essa importante fonte de estudo, o que tem permitido o surgimento de novos quimioterápicos, como é o caso do docetaxel, derivado da planta *Taxus bacana* (Calcabrini et al.¹⁵, 2004; Iida et al.⁴⁴, 2013; Pignon et al.⁸², 2000).

Uma pesquisa atual sobre substâncias de uso potencial no tratamento do câncer oral apontou cerca de 50 compostos anticancerígenos, dos quais, destacamos aqui os de origem natural: resveratrol, nimbolide, luteolina, isotiocianato de fenetil, emodina aloe, quercetina, ácido elágico, estaurosporina, azadiractina, baicaleína, berberina, genisteína, butein, curcumina, colchicina, pterostilbene, deguelin e andrografolida (Bundela et al.¹⁴, 2015).

O principal mecanismo de ação dos compostos naturais contra o câncer envolve a indução de apoptose e inibição da proliferação celular, tanto em modelos in vitro quanto in vivo (Bundela et al.¹⁴, 2015).

Entretanto, convém salientar que compostos naturais, tais como o paclitaxel, o docetaxel, a butein, a curcumina e a azadiractina podem apresentar deficiências em parâmetros físico-químicos, por demonstrar grupos de cadeias funcionais indesejáveis e não medicinais para o tratamento do câncer, limitando seu sucesso clínico (Bundela et al.¹⁴, 2015).

Por outro lado, na última década houve aumento do interesse na utilização de compostos naturais como agentes quimiopreventivos devido à melhor aceitação terapêutica em relação aos produtos sintéticos. Do mesmo modo, essa maior aceitação terapêutica deve ser precedida pela redução da toxicidade clínica dessas substâncias, para assim vislumbrar uma possível diminuição da necessidade de ressecções cirúrgicas dos tratamentos convencionais (Saba et al.⁹⁰, 2015). Desse modo, a avaliação da toxicidade dos agentes quimiopreventivos é fundamental no desenvolvimento dos estudos de ação antineoplásica (Zhou et al.¹²³, 2010).

De fato, compostos naturais apresentam percepção de segurança pela população em geral, o que facilita o desenvolvimento de ensaios clínicos futuros. Entretanto, os principais obstáculos no desenvolvimento de agentes quimiopreventivos a partir de compostos naturais são a baixa potência quimiopreventiva; falta de padronização nos métodos de produção e armazenamento para manter as concentrações constantes; biodisponibilidade reduzida, desconhecida ou alterada pelo metabolismo de diferentes genótipos; desconhecimento dos mecanismos moleculares e reduzidos estudos de eficácia e especificidade preventiva em modelos pré-clínicos (William, Papadimitrakopoulou¹¹⁷, 2013). Mas esses obstáculos podem ser ultrapassados pelo aprimoramento estrutural dos compostos naturais para produção de novas drogas quimiopreventivas mais ativas contra o câncer oral (Lin et al.⁵⁸, 2012).

O modelo de quimioprevenção em ratos induzidos por 4-NQO é o ideal para o desenvolvimento de agentes quimiopreventivos e citoprotetores na fase 0 do ensaio clínico, pois permite analisar marcadores moleculares alvos e diferentes estágios de LPMM da cavidade oral, além de permitir a análise da toxicidade renal e hepática. Permitindo a identificação da concentração inibitória do agente quimiopreventivo ou citoprotetor e a eficácia na resposta biológica (Sun et al.¹⁰⁴, 2010; Reid et al.⁸⁷, 2011; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011; Mohan et al.⁶⁷, 2016).

Esta estratégia é atualmente aplicada com o intuito de identificar novas drogas naturais utilizando substâncias com alta capacidade antioxidante em modelos de quimioprevenção utilizando o 4-NQO, como pode ser observado nos estudos descritos abaixo:

- Extrato rico em Oleuropeína de folhas de oliveira dissolvidas na água de beber e consumido em 3mg/Kg de peso corporal por 22 semanas consecutivas desde o estágio de iniciação até progressão da carcinogênese lingual com 20ppm de 4-NQO por 8 semanas, apresentando alta atividade antioxidante e bloqueio modulador do efeito sobre a proliferação celular (Grawish et al.³⁷, 2011);

- HESA-A, uma mistura de erva-marinha em pó dissolvida por uma hora em solução salina acidificada com HCl e tratada com NaOH até atingir o pH de 7,4, seguida de filtração e administração de 250 e 500mg/Kg peso corporal por gavagem oral, três vezes por semana, durante 12 semanas consecutivas desde o estágio de iniciação até progressão da carcinogênese lingual com 30ppm de 4-NQO por 12 semanas, demonstrando atividade antioxidante e maior sucesso clínico na dose de 500mg/Kg (Mehdipour et al.⁶⁵, 2013);

- Extrato de maçã na dose de 1% (1,18g/Kg) diariamente por gavagem oral, durante os estágios de carcinogênese lingual na fase de iniciação entre a 1^a-4^a semana e promoção entre a 5^a-8^a semana com 20ppm de 4-NQO por 8 semanas, verificando atividades anti-inflamatória e apoptótica por meio do padrão mitocondrial intrínseco em ambos os estágios (Ribeiro et al.⁸⁸, 2014);

- Suco de uva concentrado na dose de 1% (1,18g/Kg), diariamente, por gavagem oral durante os estágios de carcinogênese lingual na fase de iniciação entre a 1^a-4^a semana e promoção entre a 5^a-8^a semana com 20ppm de 4-NQO por 8 semanas, apresentando atividades anti-inflamatória, antioxidante e bloqueio modulador do efeito sobre a proliferação celular em ambos os estágios (Jesus et al.⁴⁶, 2014);

- Extrato de maçã na dose de 1% (1,18g/Kg) diariamente por gavagem oral, durante os estágios de carcinogênese lingual na fase de iniciação entre a 1^a-4^a semana e promoção entre a 5^a-8^a semana com 20ppm de 4-NQO por 8 semanas, apresentando atividade antioxidante com supressão de células cancerosas em ambos os estágios (Ribeiro et al.⁸⁹, 2015);

- Curcumina diluída em óleo de milho para administração via gavagem oral, diariamente de 30 e 100mg/Kg de peso corporal durante 12 semanas consecutivas a partir do estágio de iniciação até promoção da carcinogênese lingual com 50ppm de 4-NQO por 8 e 12 semanas, demonstrando atividades apoptóticas, atenuantes das expressões genéticas e bloqueios moduladores dos efeitos sobre as proliferações celulares, além do maior sucesso clínico na dose de 100mg/Kg em ambas concentrações de 4-NQO (Gonçalves et al.³⁶, 2015);

- Extrato de *Viola odorata* na dose de 5 e 15ml/Kg de peso corporal administrada por gavagem oral, 3 vezes por semana durante 12 semanas consecutivas a partir do estágio de iniciação da carcinogênese lingual com 30 ppm de 4-NQO por 12 semanas, apresentando atividade antioxidante e maior sucesso clínico na dose de 15ml/Kg (Helli et al.⁴¹, 2016).

2.4 Citoproteção de Citotoxicidade Hepática e Renal

A citoproteção é um mecanismo de controle, regressão ou interrupção dos graus leve, moderado ou grave de citotoxicidade renal e hepática por meio de agentes naturais ou sintéticos, denominados de agentes citoprotetores, nefro ou hepatoprotetores (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011). Este processo citotóxico já foi associado, gradativamente, aos estágios de carcinogênese oral das LPMM de língua induzidas por 4-NQO, sendo correlacionada ao estresse oxidativo (Nunoshiba, Demple⁷⁶, 2015; Saba et al.⁹⁰, 2015; Shrotriya et al.⁹⁷, 2015).

De fato, alguns estudos em ratos avaliaram o efeito citoprotetor de compostos naturais contra a citotoxicidade renal e hepática induzidos pelo 4-NQO, os quais descrevemos a seguir:

- Extrato em pó de *Spirulina* (alga planctônica) dissolvido em água destilada e administrada por gavagem oral (500 mg/Kg de peso corporal) por 15 dias a partir do estágio de progressão da carcinogênese oral. Os autores identificaram toxicidade nos animais tratados, exclusivamente, com 20ppm de 4-NQO por 8 semanas. No

fígado, alterações degenerativas vacuolares, necrose focal, microgranuloma, infiltrado leucocitário sinusoidal e hiperplasia de células de Kupffer, além de alterações em alanina transaminase (ALT, 62%=23,20 U/L) e aspartato transaminase (AST, 86%=28 U/L). No rim, degeneração glomerular, redução do espaço urinário e ligeira dilatação dos túbulos proximal e distal, além do aumento de creatinina (81%=0,9mg/dL) e uréia (52%=10,20mg/dL). Também relataram eficácia do antioxidante testado tanto no fígado quanto no rim, com evidência de diminuição do tamanho e número de microgranuloma no fígado e ligeira redução degenerativa do glomérulo no rim, assim como a redução de enzimas hepáticas e renais no soro em ALT (31%=19,20U/L), AST (26%=15,90U/L), creatinina (20%=0,4mg/dL) e ureia (25%=7,7mg/dL) (Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

- Extrato da folha de *Oroxylum indicum* (L.) na dose de 50, 100 e 200mg/Kg de peso corporal administrado via oral durante um mês no estágio de progressão da carcinogênese oral com 50ppm de 4-NQO por 4 meses. O 4-NQO produziu aumento nos níveis de enzimas hepáticas de AST (16%=5 U/L), ALT (85%=23 U/L) e ALP (fosfatase alcalina) (178%=125 U/L), além da creatinina (200%=0,8mg/dL). O extrato testado demonstrou atividade citoprotetora renal e hepática, além de antioxidante com redução das enzimas hepáticas e marcadores renais na dose de 50mg/Kg de AST (16%=5 U/L), ALT (20%=10 U/L), ALP (33%=65 U/L) e creatinina (29%=0,85mg/dL); na dose de 100mg/Kg de AST (23%=7 U/L), ALT (40%=20 U/L), ALP (38%=75 U/L) e creatinina (45%=0,65mg/dL); e na dose de 200mg/Kg de AST (33%=10 U/L), ALT (50%=25 U/L), ALP (48%=95 U/L) e creatinina (58%=0,5mg/dL) (Mohan et al.⁶⁷, 2016).

2.5 Quimiotipos do Óleo da Árvore do Chá

Os monoterpenos são duas unidades de isoprenos/terpenos (Gershenzon, Dudareva³⁵, 2007) formados por produtos químicos dos óleos essenciais denominados de quimiotipos (Groot, Schmidt³⁸, 2016) derivados dos metabólitos secundários de constituintes naturais de frutos, legumes e ervas responsáveis pelo mecanismo de defesa de várias espécies de plantas (Gershenzon, Dudareva³⁵, 2007). São utilizados pela indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica, entretanto, seu potencial anticancerígeno necessita ser mais explorado e estudado em relação ao seu potencial de inibição da proliferação e indução da morte de

células tumorais, como já foi feito em estudos de ensaio clínico na fase II com o álcool perílico e limoneno (Sobral et al.¹⁰⁰, 2014).

A *Melaleuca alternifolia* é uma árvore nativa da região norte e sul da Austrália e seu óleo, também chamado de “Tea Tree Oil” (TTO), é extraído das folhas ou ramos por processo de destilação a vapor (Groot, Schmidt³⁸, 2016).

O TTO demonstrou atividades anti-inflamatória, bactericida, analgésica, antivirótica, antifúngica e antitumoral (Carson et al.¹⁷, 2006; Barbosa et al.¹⁰, 2013; Pereira et al.⁸⁰, 2014). Também foram observadas ações clínicas na mucosa oral em uso tópico, reduzindo inflamação e infecção sem apresentar efeitos adversos (Groot, Schmidt³⁸, 2016).

O TTO apresenta-se como líquido de coloração amarelo claro com odor mentolado. Devido a sua variação de composição na natureza, a Organização Internacional de Padronização publicou as concentrações máximas e mínimas de seus componentes para o uso comercial (ISO - 4730:2004), nela os seguintes tipos de terpenos foram descritos: TP-4-ol (48-30%), γ -terpineno (28-10%), 1,8 cineol (15%-vestígio), α -terpineno (13-5%), α -terpineol (8-1,5%), p-cimeno (8-0,5%), α -pineno (6-1%), limoneno (1,5-0,5%), além de outros descritos em menores concentrações (Groot, Schmidt³⁸, 2016).

Alguns componentes do TTO sofrem alterações quando expostos ao oxigênio atmosférico, luz, umidade e temperatura elevada, principalmente quando o recipiente de conservação fica aberto por várias horas. Desse modo, o TP-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno e terpinoleno são oxidados em peróxidos, endoperóxidos, epóxidos e p-cimeno que podem aumentar a concentração em até 10 vezes, causando toxicidade (Harkenthalet al.³⁹, 2000; Sciarronea et al.⁹⁴, 2010).

O uso clínico de TTO em concentrações maiores ou iguais a 2% apresenta grande número de casos de reação alérgica local e sistêmica em humanos, principalmente em mulheres, provenientes de preparações tópicas do óleo puro ou pasta de dente, cuja reação foi descrita como estomatite oral (Groot, Schmidt³⁸, 2016; Monthrope, Shaw⁶⁹, 2004; Nardelli et al.⁷², 2009).

O TP-4-ol é responsável por 6% das reações alérgicas e menos de 16% quando associado ao TTO (Groot, Schmidt³⁸, 2016).

2.6 Terpinen-4-ol

Dentre os 100 quimiotipos do TTO, o TP-4-ol é o mais concentrado e abundante, e também encontrado em diversas plantas aromáticas de várias regiões do mundo, como a laranjeira, a tangerineira, o limoeiro, o cedro e a pimenteira (pimenta preta) (Pino et al.⁸⁴, 2003).

Os estudos realizados com TP-4-ol demonstraram grande gama de atividades, tais como bactericida para bactérias aeróbias e anaeróbias, gram-positivas ou negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*) (Dryden et al.²², 2004; Loughlin et al.⁶⁰, 2008; Yang et al.¹²⁰, 2011), bacteriostática para bactérias resistentes a drogas como oxacilina (Yang et al.¹²⁰, 2011), antifúngica (*Candida albicans* isoladas e resistentes ao fluconazol ou itraconazol) (Barra et al.¹¹, 2007; Mertas et al.⁶⁶, 2015; Mondello et al.⁶⁸, 2006), antiparasitária (Baldiessa et al.⁸, 2016), anti-inflamatória (Bakkali et al.⁹, 2008), antivirótica (Astani et al.⁵, 2010; Bakkali et al.⁹, 2008; Garozzo et al.³², 2011), antibacteriana da cavidade oral (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*) (Cha et al.¹⁸, 2007), antibiofilme microbiano (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) (Budzyńska et al.¹³, 2011), relaxante da musculatura lisa vascular (inibindo o influxo de Ca^{2+}) (Maia-Joca et al.⁶², 2014), hipotensiva (Lahlou et al.⁵⁵, 2003), anticonvulsivante (Nóbrega et al.⁷⁴, 2014), antibacteriano e antifúngico associado a drogas convencionais como o gluconato de clorexidina e fluconazol contra resistência bacteriana e fúngica (Shapira et al.⁹⁵, 2016) antioxidante (Barra et al.¹¹, 2007) e anticancerígena (Shapira et al.⁹⁵, 2016; Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Os estudos da atividade antitumoral do TP-4-ol demonstraram estímulo da morte celular em células malignas pela indução de apoptose dependente de caspase e necrose e interrupção do ciclo celular em concentrações que variaram de 0,005% a 0,1%. Os estudos incluíram linhagens celulares de carcinoma epitelial (HeLa), leucemia linfoblástica humana de células T (MOLT-4), leucemia mielóide crônica humana (K562), leucemia mielóide aguda de células B humana (CTVR-1), melanoma humano (B16), melanoma humano, variante resistentes a drogas (M14WT), mesotelioma murino (Ae17), adenocarcinoma de pulmão humano

(A549), carcinoma de células pequenas de pulmão de camundongos (A549/CL1-0); carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e adenocarcinoma col retal humano (DLD-1) chegaram a demonstrar inibição de proliferação de 20-56% na proliferação celular (fase G₂/M do ciclo celular), indução de morte celular por apoptose em 45-90% e, até mesmo, ausência de necrose (Sobral et al.¹⁰⁰, 2014; Shapira et al.⁹⁵, 2016; Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Os mecanismos de ação antitumoral do TP-4-ol demonstram-se dose-dependente e relacionados à morte celular por apoptose, associada a interrupção do ciclo celular no ponto de checagem sub-G₁. Este processo foi associado à ativação de caspase 9 que cliva e ativa a caspase 3 e ambas clivam e ativam a poliadenosina difosfato de ribose polimerase (PARP) pertencentes à via intrínseca mediada por mitocôndria. Esta via intrínseca está relacionada também à perda do potencial da membrana mitocondrial por despolarização que libera frações do citocromo c para o citosol celular diminuindo os níveis expressos das proteínas anti-apoptóticas da família de células de linfoma-B 2 (BCL-2) e proteínas inibidoras de apoptose (IAP) como a survivina e ligada ao X (XIAP) que inibe sua ação e a atividade de caspase 3 e 9, consequentemente aumentando as expressões das proteínas pró-apoptóticas associada ao X (BAX) atuante na interrupção do ponto de checagem sub-G₁ que ativa sua ação apoptótica (Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Outro mecanismo de morte celular induzida por TP-4-ol foi explicado por meio da apoptose tardia ou necrose, interrompendo o ponto de checagem G₂/M do ciclo celular, que foi identificada devido a diminuição da expressão da proteína p53 que ativa caspase 3 e PARP indutora de apoptose (Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Portanto, frequentemente, o TP-4-ol apresenta morte celular por apoptose e necrose de células tumorais.

Já estudo realizado em animais, em modelo de xenoenxerto com injeção subcutânea de células de adenocarcinoma de col retal humano (HCT116/DLD1) no flanco direito de camundongos, posteriormente tratados com TP-4-ol, demonstrou atividade antitumoral dose dependente na administração sistêmica de 4mg, assim como atividade antitumoral após a injeção intratumoral de 0,1% combinada com a injeção intraperitoneal (10mg/Kg) de Erbitux (cetuximab), duas vezes por semana, durante três semanas. Os autores relataram eficácia de mais de 70% (sistêmica) e 60% (intratumoral combinada ao cetuximab) na redução do volume e peso tumoral sem nenhum efeito adverso (Shapira et al.⁹⁵, 2016).

Outro estudo, também utilizando modelo de xenoenxerto em fêmeas de camundongos e injeção subcutânea no flanco direito de células pequenas de carcinoma pulmonar de camundongos (A549) e posteriormente tratados com administração intravenosa de 100µL (0,06% e 0,1%) de TP-4-ol, diariamente, por 18 dias, resultou em eficácia na redução do volume tumoral de 33,4% para a menor concentração e 83,4% para a maior concentração, induzindo apoptose e inibindo proliferação celular, sem nenhum efeito adverso (Wu et al.¹¹⁸, 2012).

Além disso, o TP-4-ol demonstrou maior solubilidade em água, biodisponibilidade e eficácia em nano formulações, quando aplicado em suspensão sistemicamente e em baixas concentrações para a quimioprevenção de vários tipos de câncer incluindo o carcinoma de língua. Apesar destas vantagens, as nanogotas de TP-4-ol demonstraram grave toxicidade com redução do peso corporal e aumento da mortalidade (Shapira et al.⁹⁵, 2016).

Todavia, a administração de TP-4ol por gavagem oral causou pouca toxicidade aguda em camundongos, quando tratado abaixo da dose letal (DL₅₀) de 1457,8mg/ml (Yang et al.¹²⁰, 2011).

Os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da injeção intravenosa de 2mg/Kg de TP-4-ol em modelo de ratos *Wistar* demonstraram pico de 23,3% TP-4-ol livre no plasma após 30 minutos, com 76,7% ligado a proteína plasmática. A meia vida foi estimada em 2 horas e 20 minutos no plasma e 1 hora e 17 minutos na derme. Já para os parâmetros farmacológicos bioanalíticos, intra e interdias da concentração de TP-4-ol extraído do plasma (90,3%) e da derme (98,6%) asseguraram a estabilidade das amostras na temperatura/período de 25°C/24 horas ou -20°C/1 mês (Chooluck et al.¹⁹, 2013).

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

Embora o modelo de xenoenxerto propicie dados sistêmicos importantes, este modelo utiliza tumores clonais o que limita a extrapolação dos resultados tornando-os específicos para as células analisadas, além disso, utilizam animais imunossuprimidos, o que retira da análise os efeitos do sistema imunológico no tratamento realizado.

O modelo de quimioprevenção em ratos induzidos por 4-NQO propicia um salto na análise, pois 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), dados esses que permitem o acompanhamento da atividade quimiopreventiva e/ou citotóxica hepática e renal dos animais (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Suzuki et al.¹⁰⁶, 2006). Além de mais, sendo um modelo de oncogênese produzida individualmente para cada animal, apresenta-se similar ao processo de carcinogênese em humanos, tanto nos sinais clínicos quanto nos diferentes estágios de desenvolvimento tumoral (Nauta et al.⁷³, 1995), permitindo a construção de um quadro geral das consequências da exposição à substância experimental.

Esta associação de análises de parâmetros biométricos, bioquímicos, macroscópicos e microscópicos, no experimento quimiopreventivo, citoprotetor e citotóxicos em modelo de carcinogênese lingual e citotoxicidade renal e hepática em ratos saudáveis e oncológicos, permite a construção de um quadro geral de exposição à substância experimental.

2.7.1 Parâmetros biométricos

A análise de parâmetros biométricos como consumo de água, ração, 4-NQO e TP-4-ol (Shrotriya et al.⁹⁸, 2015) associada ao peso do animal, fígado, rim (Naoi et al.⁶⁵, 2010) e língua é um indicador relevante da perda ou ganho de peso dos órgãos ou animais nas fases de promoção e progressão do CEC oral em modelo de quimioprevenção utilizando 4-NQO (McCormick et al.⁶⁴, 2010), principalmente devido a pouca influência da droga quimiopreventiva na perda de peso em processos de toxicidade (Mehdipour et al.⁶⁵, 2013).

2.7.2 Parâmetros bioquímicos

As dosagens bioquímicas no plasma de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) permitem investigar essas enzimas intracelulares dos hepatócitos que atingem a corrente sanguínea após lesão celular. O ALT aumenta drasticamente em processos de lesões hepáticas

agudas, tais como hepatite viral ou overdose por paracetamol. O AST também aumenta nas lesões hepáticas agudas, entretanto, pode estar associada a lesões em hemácias, músculo estriado e cardíaco. A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima presente nas células dos ductos biliares, seus níveis plasmáticos aumentam em grandes obstruções biliares, colestases intra-hepáticas ou doenças infiltrativas do fígado (Amacher³, 2002; Ramaiah⁸⁶, 2007; Titcomb¹¹⁰, 2003).

A creatinina é um produto da metabolização da fosfocreatina muscular. Apresenta-se constante no sangue e a creatinina urinária é um parâmetro para calcular a taxa de filtração glomerular, sendo, portanto, relacionada à função renal. A uréia é formada principalmente no fígado, sendo filtrada pelos rins e eliminada na urina ou no suor. É fruto do metabolismo proteico, portanto, seus níveis podem alterar sob aumento ou redução do metabolismo, além de poderem indicar alterações do processo de filtração glomerular (Bagshaw, Gibney⁷, 2008; Pianta et al.⁸¹, 2013; Schwartz, Work⁹³, 2009; Vanholder et al.¹¹³, 2003).

As análises de ALT, AST, ALP, ureia e creatinina são indicadores sensíveis para a identificação de lesão hepática e de alteração da função renal, mesmo quando as características histopatológicas ainda não são evidentes. São consideradas importantes para eliminação de viés e aumento da evidência científica do experimento, devido à avaliação da citotoxicidade renal e hepática em experimentos utilizando 4-NQO e substâncias de reconhecida atividade antioxidante, como o TP-4-ol (Kim et al.⁵², 2004; Manaia et al.⁶³, 2015; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

2.7.3 Parâmetros macroscópicos

As análises macroscópicas da língua (Grawish et al.³⁷, 2011), fígado (Piña-Zentella et al.⁸³, 2016; Salama et al.⁹¹, 2012) e rim (Shuvy et al.⁹⁹, 2011) do rato proveniente de modelos de induções patológicas (Piña-Zentella et al.⁸³, 2016; Salama et al.⁹¹, 2012; Shuvy et al.⁹⁹, 2011) como é o caso do 4-NQO (Grawish et al.³⁷, 2011), são importantes na evidenciação clínica do efeito protetor (integridade) ou tóxico (lesões/alterações de tamanho) sob a morfologia dos órgãos analisados (Grawish et al.³⁷, 2011; Piña-Zentella et al.⁸³, 2016; Salama et al.⁹¹, 2012; Shuvy et al.⁹⁹, 2011).

2.7.4 Parâmetros microscópicos

As análises microscópicas de tecidos permitem a observação de achados micromorfológicos em análises semi-quantitativas ou quantitativas. A classificação inflamatória justifica-se pela alta prevalência de células inflamatórias peri e intra tumorais nas LPMM induzidas pelo 4-NQO (Tanaka et al.¹⁰⁹, 2014).

O sistema binário de análise histopatológica nas LPMM (Kujan et al.⁵⁴, 2006) e a análise da invasão microscópica do CEC oral permitem a indicação da eficácia quimiopreventiva para o desenvolvimento tumoral induzido pelo 4-NQO mediante a exacerbação ou regressão das LPMM de língua (McCormick et al.⁶⁴, 2010; Peng et al.⁷³, 2015) e lesões histopatológicas do processo de invasão do CEC oral quando comparados com o controle positivo (William, Papadimitrakopoulou¹¹⁷, 2013).

As análises microscópicas do fígado e rim do rato demonstram pela classificação de alterações inflamatórias, vasculares e celulares, possíveis alterações histológicas propiciadas pelo 4-NQO, pela substância teste ou pela associação de ambas, quando comparadas com o controle negativo (Lim et al.⁵⁷, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Hipóteses nulas (H_0)

- O TP-4-ol não é eficaz na quimioprevenção de LPMM na língua de ratos oncológicos induzidos por 4-NQO?
- O TP-4-ol não é eficaz na citoproteção de hepato e nefrotoxicidade de ratos hepatopatas e nefropatas induzidos por 4-NQO?
- O TP-4-ol não apresenta potencial de hepato e nefrotoxicidade em ratos saudáveis?

3.2 Hipóteses alternativas (H_1)

- O TP-4-ol é eficaz na quimioprevenção de LPMM na língua de ratos oncológicos induzidos por 4-NQO?
- O TP-4-ol é eficaz na citoproteção de hepato e nefrotoxicidade de ratos hepatopatas e nefropatas induzidos por 4-NQO?
- O TP-4-ol apresenta potencial de hepato e nefrotoxicidade em ratos saudáveis?

3.3 Objetivos específicos

Analisar o potencial quimiopreventivo, citoprotetor e citotóxico de duas concentrações distintas de TP-4-ol em ratos saudáveis e oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas induzidos por 4-NQO após 16 semanas do protocolo experimental, nos seguintes parâmetros:

- Biométrico para avaliação quimiopreventiva e citotóxica por meio da mensuração do peso corporal, lingual, do fígado e rim do rato, além do consumo de água e alimento;

- Bioquímico no sangue para avaliação citoprotetora e citotóxica pelas dosagens do plasma de marcadores do fígado como ALT, AST e ALP, além de marcadores do rim como a ureia e creatinina;
- Macroscópico na língua para avaliação quimiopreventiva do tamanho dos órgãos e presença de lesões fundamentais;
- Macroscópico no rim e fígado para avaliação citoprotetora e citotóxica do tamanho dos órgãos;
- Microscópico do tecido lingual para avaliação quimiopreventiva contra LPMM por meio das classificações de alterações histopatológicas, risco de malignização da displasia moderada, invasão tumoral e infiltrado inflamatório;
- Microscópico do rim e fígado para avaliação citoprotetora e citotóxica por meio da classificação de alterações citotóxicas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Instituição do Tratamento com Terpinen-4-ol

O (-)-TP-4-ol (negativo) de 25g foi obtido da empresa Sigma^(R) e mantido nas condições recomendadas pelo fabricante. As doses de tratamentos com o TP-4-ol de 0,035g/Kg e 0,0035g/Kg de peso corporal dos ratos foram homogeneizadas a cada 1 mL de água purificada para o protocolo de tratamento experimental via gavagem oral.

Considerando os resultados obtidos do potencial antineoplásico por Wu et al.¹¹⁸ (2012) na dose de 0,1g de TP-4-ol, ou seja, pela injeção intravenosa de 100µL/Kg de peso corporal do camundongo pesando 350g (modelo com xenoenxerto de células pequenas de carcinoma pulmonar de camundongos), realizamos a regra de três simples para obter a concentração relativa por quilo de peso corporal para ratos *Holtzman*, resultando em 100% (0,035g/Kg) e 10% (0,0035g/Kg). Vale ressaltar que estas doses de tratamentos equivalem respectivamente a 1/40 (0,035g/Kg) e 1/400 (0,0035g/Kg) da dose letal de 50% (DL 50) do TP-4-ol administrado via gavagem oral de 1,4g/Kg de peso corporal do camundongo (Yang et al.¹²⁰, 2011).

4.2 Ensaios In Vivo

4.2.1 Ratos (*Rattus norvergicus* albinos, *Holtzman*)

Foram utilizados 64 ratos (*Rattus norvergicus* albinos, *Holtzman*), machos, com 8 semanas de idade, com peso entre 120 e 130g, provenientes do Biotério Central da UNESP e mantidos em gaiolas plásticas (n=4) em um ambiente com temperatura controlada (21±1 °C), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12 escuro) e alimentados com água e ração à vontade.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara com o protocolo nº 8/2015 (ANEXO A) de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e Instrução Normativa nº 04 de 18 de junho de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil acerca de

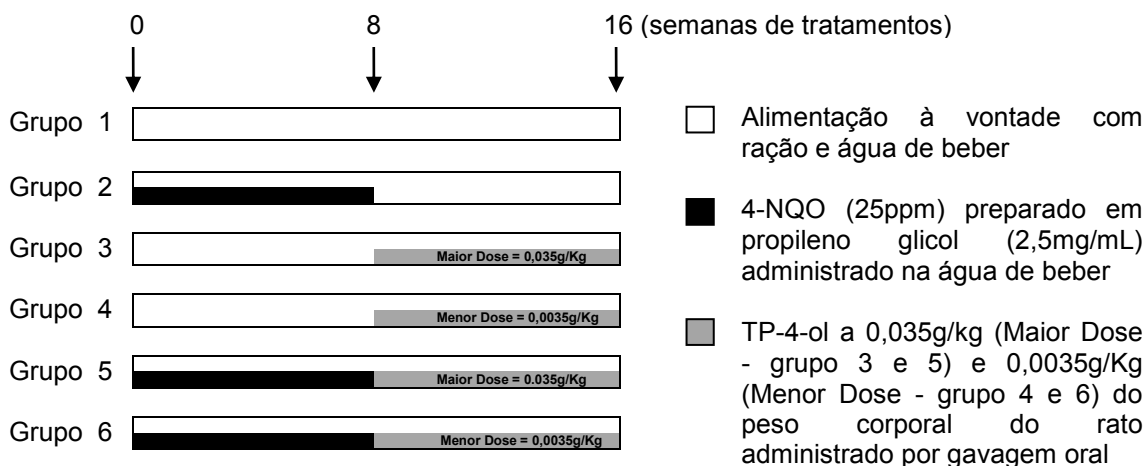
estudo não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessário ao desenvolvimento e registro de medicamentos fitoterápicos.

4.2.2 Desenho experimental

Após uma semana de ambientação, os ratos foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n=64) para o experimento no período de 16 semanas, o grupo 1 (G1) controle negativo ou grupo 2 (G2) controle positivo (n=8) e o grupo 3 (G3), grupo 4 (G4), grupo 5 (G5) e grupo 6 (G6) intervenção (n=12). Os ratos saudáveis do G1, G3 e G4 foram alimentados à vontade com ração e água de beber por 16 semanas, sendo que nas 8 semanas finais foram tratados com TP-4-ol via gavagem oral, o G3 com a maior dose de 0,035g/Kg e o G4 com a menor dose de 0,0035g/Kg. Os outros grupos foram induzido quimicamente a carcinogênese lingual com 25ppm de 4-NQO (Sigma, USA) preparado em 2,5mg/ml de propileno glicol, administrado na água de beber, durante 8 semanas iniciais, sendo que nas 8 semanas finais apenas o G2 foi alimentado à vontade. Os outros dois grupos foram tratados com o TP-4-ol via gavagem oral, o G5 com a maior dose de 0,035g/Kg e o G6 com a menor dose de 0,0035g/Kg.

O período de tratamento quimiopreventivo utilizando as duas doses do TP-4-ol foi realizado no estágio de progressão (9^a a 16^a semanas) do carcinoma de língua (Ribeiro et al.⁸⁹, 2015). A análise da citotoxicidade hepática e renal foi realizada utilizando parâmetros bioquímicos e histopatológicos. O protocolo de indução de carcinogênese pelo 4-NQO e os tratamentos quimiopreventivos experimentais estão descritos na figura 1 e foram desenvolvidos conforme os estudos de Kasai et al.⁵¹ (2000) e Zhao et al.¹²² (2014).

Figura 1 – Protocolo para indução de carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental dos G1 (ratos saudáveis), G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol), G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol).



Fonte: Autoria própria.

4.3 Sacrifício

Foi realizada a eutanásia ao final do experimento de 16 semanas consecutivas dos seis grupos experimentais com decapitação cervical por guilhotina, uma vez que, este método não contamina quimicamente o sangue e tecidos, como ocorre por meio dos métodos químicos de eutanásia e também por necessidade de coleta de maior volume de sangue para análise de múltiplos parâmetros bioquímicos ao mesmo tempo (Diehl et al.²⁰, 2001; Nolen⁷⁵, 2011). Foi executado por pesquisador previamente treinado, no início da manhã, para coleta dos órgãos que foram analisados mediante parâmetro biométrico, macroscópico e microscópico.

4.4 Análise de Parâmetros Biométricos

A balança de precisão foi utilizada para pesar animais e órgãos. A proveta de vidro foi utilizada para mensurar os volumes de líquidos. Foram mensurados os seguintes parâmetros: peso corporal de cada rato no período inicial e final do protocolo experimental [PRi-PRf(g)] (Shiotani et al.⁹⁶, 2001); peso da língua (PL.100/PRf), peso do fígado (PF.100/PRf) e peso do rim de cada rato após o

sacrifício (PR.100/PRf) (Aloia et al.², 2010); e o consumo de água (ml) e alimento (g) por semana em cada grupo experimental (Shiotani et al.⁹⁶, 2001).

4.5 Análise de Parâmetros Bioquímicos

Após o sacrifício por decapitação cervical, foram coletados 3mL de sangue total de cada rato, os quais foram mantidos em tubos de vidro contendo heparina sódica. Os tubos foram então centrifugados a 2.500 r.p.m. por 10 minutos para separação do plasma. As dosagens bioquímicas dos marcadores do fígado e rim como ALT, AST, ALP, ureia e creatinina foram realizadas utilizando kits comerciais da ©Ortho-Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson Company) no autoanalisador Vitrus® 250, por meio da tecnologia de química seca. O processo se inicia após 11µL de cada amostra ser inserido no “slide” do aparelho. Esse “slide” é composto por cinco camadas filtradoras de interferentes de alto peso molecular como proteínas, adicionado de membranas e reagentes específicos para cada marcador hepático e renal. O processo é monitorado por espectrofotometria de reflectância, que é convertida, utilizando a taxa de variação de densidade de reflexão, em concentrações dos marcadores analisados. O tempo total de análise é cerca de 2 a 5 minutos.

O ALT e AST são enzimas catalisadoras, respectivamente de piruvato e oxalacetato glutâmico, presentes no citoplasma dos hepatócitos e mitocôndria em menor concentração (apenas o AST). O ALP é uma enzima hidrolisadora de fosfato, presente nas células epiteliais dos ductos biliares do fígado. As elevações das concentrações do ALT, AST e ALP são em virtudes, respectivamente, de lesão no fígado, tecido (fígado, coração, músculo, cérebro e rim) e ducto hepatobiliar, denominado de coléstase. Já a hepatotoxicidade é devido à elevação do ALP, ALT isolado ou combinado ao AST (Amacher³, 2002; Ramaiah⁸⁶, 2007; Titcomb¹¹⁰, 2003).

A ureia e creatinina são metabólitos nitrogenados e derivados, respectivamente, de proteínas dietéticas ou da renovação tecidual e catabolismo de creatina muscular, ambos filtrados pelos glomérulos renais. A ureia é reabsorvida (40-50%) pelos túbulos renais. As elevações das concentrações de ureia e creatinina são relacionadas a lesão renal aguda proveniente da necrose tubular aguda e redução maior que 50% da taxa de filtração glomerular. Entretanto, também observam-se aumentos isolados de creatinina em processos de nefrotoxicidade

(Bagshaw, Gibney⁷, 2008; Pianta et al.⁸¹, 2013; Schwartz, Work⁹³, 2009; Vanholder et al.¹¹³, 2003).

4.6 Análise de Parâmetros Macroscópicos

Após o sacrifício foram coletadas e identificadas a língua, o fígado e o rim para análises macroscópicas. A língua foi fotografada imediatamente após sua exérese. Depois os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas.

As análises macroscópicas dos órgãos foram realizadas reconhecendo e descrevendo o tipo e tamanho (comprimento x altura x largura=mm³) do órgão e das lesões.

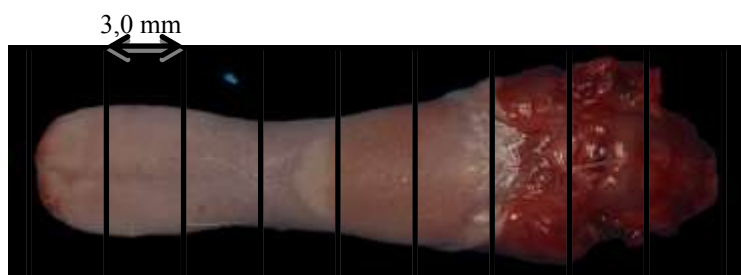
Especificamente para a língua, nas análises macroscópicas, consideramos os tipos de lesões fundamentais e seus aspectos clínicos como: mancha (lesão plana de área circunscrita com alteração de cor da mucosa em relação ao tecido circunjacente), placa (lesão sólida e ligeiramente elevada com extensão maior que 5mm, bem delimitada e superfície lisa ou rugosa), pápula (lesão sólida e elevada menor que 5mm, bem delimitada, superfície pontiaguda, arredondada, plana ou rugosa, única ou agrupada, localizada no epitélio ou lâmina própria), nódulo (lesão sólida e elevada maior que 5mm, bem delimitada, superfície plana ou rugosa, única, localizada no tecido conjuntivo), vesícula (lesão líquida e elevada menor que 5mm, forma semi-esférica, bem delimitada, superfície lisa, única ou agrupada, localizada intra ou subepitelial), bolha (lesão líquida e elevada maior que 5mm, bem delimitada, superfície lisa, localizada intra ou subepitelial), erosão (lesão ligeiramente depressiva com perda parcial do epitélio sem exposição do tecido conjuntivo) e úlcera (lesão depressiva com perda total do epitélio com exposição do tecido conjuntivo) (Federman, Kirsner²⁴, 2002; Federman et al.²⁵, 2001; Gambino et al.³¹, 2015; Hipólito, Martins⁴², 2010).

4.7 Análise de Parâmetros Microscópicos

Após as análises macroscópicas os tecidos foram desidratados, diafanizados com xilol e, posteriormente, incluídos em parafina histológica. Os blocos de tecido foram então submetidos a micrótomo rotatório e cortes de 4 µm foram obtidos para posterior coloração em Hematoxilina e Eosina.

Especificamente para as línguas, após a macroscopia, foram realizados cortes histológicos seriados do ápice da língua para a base. Cada secção apresentou 3 mm de largura e os cortes foram organizados no interior do cassete de modo a impedir que uma mesma região fosse avaliada em dois cortes subsequentes (Figura 2).

Figura 2 – Cortes seriados das línguas a cada 3,0 mm.



Fonte: Autoria própria.

Todas as análises foram realizadas de forma cega e independente por patologista experiente, anteriormente calibrado com concordância de replicabilidade excelente intra-examinador por meio do coeficiente de correlação intraclass com reprodutibilidade de 15% das amostras em dois momentos distintos ($P=1,0/p<0,0001$). Os órgãos foram examinados nos aumentos de 100, 200 e 400x sob microscópio de luz (*Carl Zeiss, Primo Star, Germany*).

As línguas foram analisadas de acordo com os seguintes parâmetros histopatológicos. Classificação adaptada de alterações histopatológicas (Quadro 1); Classificação adaptada do risco de malignização da displasia moderada de língua, considerando a margem de transição entre a displasia leve de baixo risco e a displasia grave de alto risco (Quadro 2, Kujan et al.⁵⁴, 2006); Classificação modificada da invasão microscópica do carcinoma lingual (Quadro 3, McCormick et al.⁶⁴, 2010; Peng et al.⁷⁹, 2015); Classificação adaptada e modificada de intensidade e tipo de infiltrado inflamatório (Vizzotto Junior et al.¹¹⁵, 2003) no carcinoma lingual de ratos induzidos por 4-NQO (Quadro 4, Tanaka et al.¹⁰⁹, 2014).

Para localizarmos as alterações histopatológicas nas línguas dos animais, todos os achados histopatológicos foram registrados especificamente quanto à

localização em face: dorso, borda lateral ou ventre; região: anterior (sulco central no dorso lingual com extensa faixa de tecido epitelial), média (protuberância central no dorso lingual com pouca faixa de tecido epitelial e ausência de tecido glandular no interior do músculo lingual) ou posterior (duas eminências em lados opostos no dorso lingual com amplo tecido conjuntivo e tecido glandular intra-muscular); e posição: direita, mediana ou esquerda (Figura 3).

Os rins e fígados foram analisados conforme parâmetros histopatológicos e classificados modificadamente em alterações citotóxicas específicas (Lim et al.⁵¹, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

Para os rins, analisamos a região cortical (glomérulo aumentado, atrófico ou necrótico; acúmulos intra ou intercelulares de pigmentos; integridade da cápsula de Bowman; espaço urinário reduzido ou ampliado; ducto proximal e distal edemaciado, necrótico ou com acúmulo de pigmento) e medular (ductos edemaciados ou necróticos e infiltrado inflamatório - tipo e intensidade) (Lim et al.⁵¹, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

Para os fígados, analisamos as regiões de espaço porta, inter-lobular e centro-lobular (presença de congestão em espaço porta ou veia centro-lobular, pigmentação intravascular e alterações em sinusóides ou hepatócitos - edema, lipidose, acúmulo pigmentares e necrose) (Lim et al.⁵¹, 2010; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

Tanto para o fígado quanto para os rins, os resultados histopatológicos específicos foram, posteriormente, organizados e classificados em alterações citotóxicas gerais da seguinte forma: 0 = nenhuma alteração distinguível de 0%; 1 = leve alteração com evidência até 30%; 2 = moderada alteração com evidência de 31–60%; 3 = alteração grave com ampla propagação de 61–100% (Lee et al.⁵⁶, 2008).

Quadro 1 – Classificação adaptada das alterações histopatológicas.

Tipo	Alteração tecidual
Hiperplasia escamosa	Camada espinhosa (hipertrofia/espessamento) e/ou camada basal/parabasal (hiperplasia celular basal) com estratificação regular da arquitetura sem atipias celulares
Displasia leve	Terço inferior do epitélio arquitetônico com atipias celulares
Displasia moderada	Até o terço médio do epitélio arquitetônico com atipias celulares
Displasia grave	Mais que dois terços do epitélio arquitetônico com atipias celulares
Papiloma	Projeções papilares exofíticas contendo ilhas de tecido conjuntivo

Fonte: Autoria própria adaptada de Kujan et al.⁵⁴ (2006).

Quadro 2 – Classificação adaptada do risco de malignização da displasia moderada de língua.

Sistema	Binário	Risco de Malignização
Alteração arquitetônica	Alteração citológica	
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho nuclear (anisonucleose)	Baixo risco
Perda de polaridade das células basais	Variação anormal na forma nuclear (pleomorfismo nuclear)	≤ 3 alterações arquitetônicas ≤ 4 alterações citológicas
Cristas epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho celular (anisocitose)	
Aumento do número de figuras de mitose	Variação anormal na forma celular (pleomorfismo celular)	
Mitoses anômalas superficiais	Aumento da proporção núcleo-citoplasma	Alto risco
Queratinização prematura em células isoladas	Aumento no tamanho nuclear	≥ 4 alterações arquitetônicas ≥ 5 alterações citológicas
Pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais	Figuras de mitoses atípicas	
–	Aumento do número e tamanho de nucléolos	
–	Hipercromatismo	

Fonte: Autoria própria adaptada de Kujan et al.⁵⁴ (2006).

Quadro 3 – Classificação modificada da invasão microscópica do carcinoma lingual.

Carcinoma lingual	Extensão tecidual
In situ	Presença de células malignas no epitélio sem romper a membrana basal subjacente
Micro-invasivo	Presença de células malignas no epitélio com rompimento da membrana basal subjacente
Invasivo	Presença de células malignas na lâmina própria do tecido conjuntivo, mas sem ocorrer à invasão do tecido muscular estriado subjacente
Profundamente invasivo	Presença de células malignas na lâmina própria do tecido conjuntivo e invadindo o tecido muscular estriado subjacente

Fonte: Autoria própria modificada e adaptada de McCormick et al.⁵⁴ (2010) e Peng et al.⁷⁹ (2015).

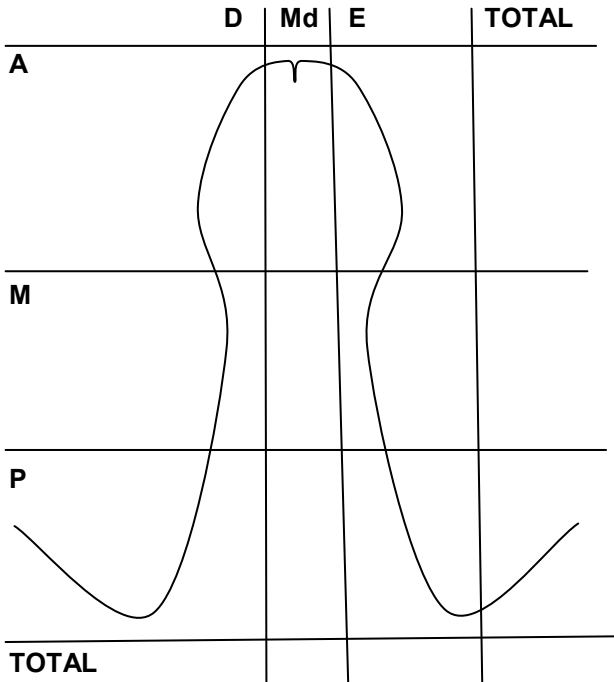
Quadro 4 – Classificação modificada e adaptada de intensidade e tipo do infiltrado inflamatório do carcinoma lingual.

Parâmetro Inflamatório	Intensidade				Tipo (escore final)
	Ausente (0%)	Discreta (1-33%)	Moderada (34-66%)	Acentuada (>66%)	
Neutrófilos	0	-1	-2	-3	Agudo (-9 a -3)
Edema intersticial					Subagudo (-3,1 a 3)
Congestão vascular					
Monomorfonucleares	0	1	2	3	Crônico (3,1 a 9)
Tecido de granulação					
Fibrose					

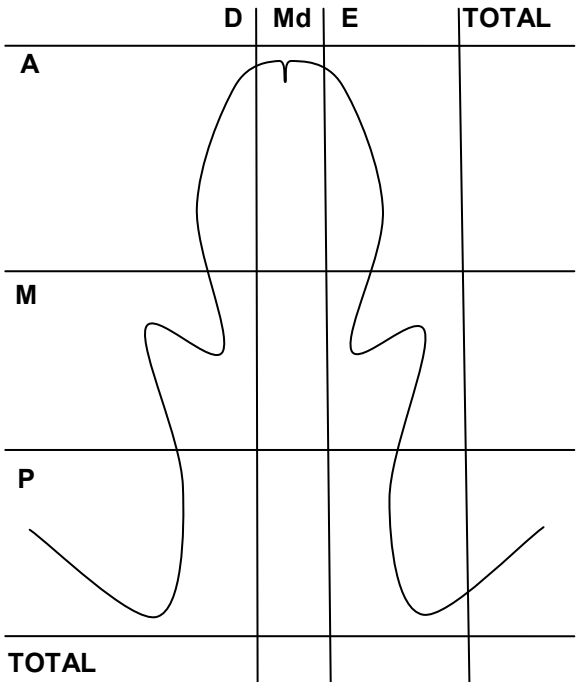
Fonte: Autoria própria modificada e adaptada de Vizzotto Junior et al.¹¹⁵ (2003) e Tanaka et al.¹⁰⁹ (2014).

Figura 3 – Desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* para quantificação da localização de lesão quanto à face, região e posição. **(a)** Face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

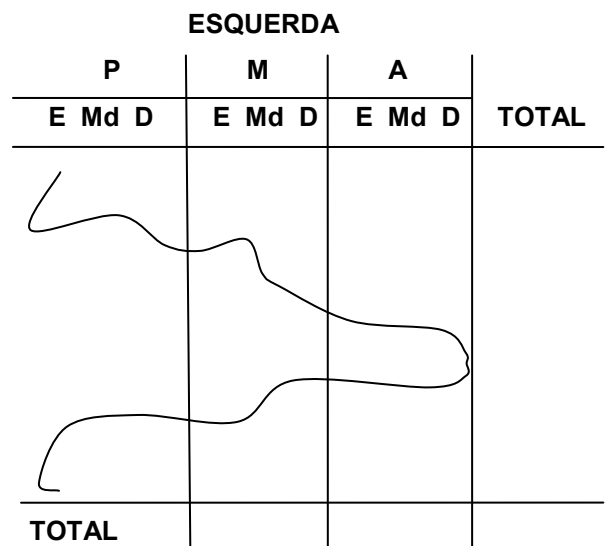
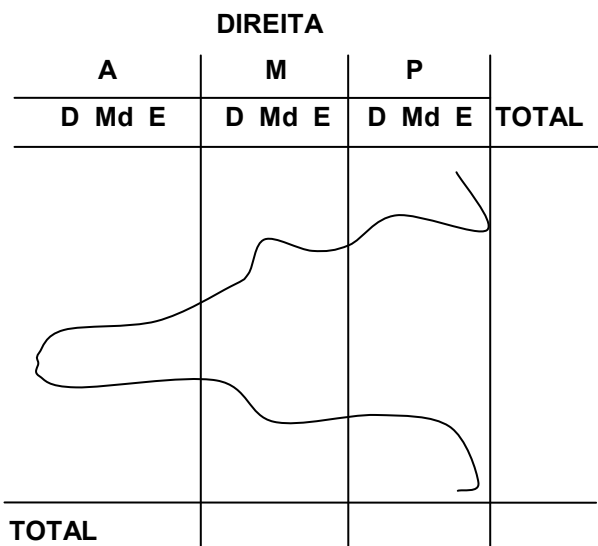
(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA



(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA



(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA



Fonte: Autoria própria.

4.8 Expressões dos Resultados e Análises Estatísticas

Os resultados foram agregados e as médias e desvios-padrão foram obtidas nos diferentes grupos experimentais para comparação múltipla de K amostras por meio da ANOVA (One/Two-Way) seguido de pós-teste de Tukey's (parâmetros biométricos, macroscópicos e microscópicos) e Newman-Keuls (parâmetros bioquímicos) por meio do software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), considerando 5% como nível de significância estatística ($IC_{95\%}$; $p < 0,05$), sendo apenas descritos os resultados estatisticamente significantes, representados por $^{\alpha}=p < 0,05$, $^{\beta}=p < 0,01$ e $^{\gamma}=p < 0,0001$.

5 RESULTADO

Iniciamos nosso experimento com 64 ratos, um rato oncológico de língua, hepatopata e nefropata, tratado do G5 morreu durante a 12ª semana do experimento, não incluído na análise dos resultados (n=63). O rato em questão apresentou sinais de desconforto como disfagia, perda de peso corporal e eriçado no momento da gavagem oral. Interrompemos por uma semana a indução de carcinogênese lingual com o 4-NQO, substituindo por água. Nossos esforços não foram capazes de reverter o quadro clínico do rato e o mesmo veio a óbito.

5.1 Análise de parâmetros biométricos

A figura 4 apresenta os resultados obtidos nas análises dos parâmetros biométricos. É possível verificar que, a partir da 14ª semana de tratamento, a curva de ganho de peso nos G4 (menor dose TP-4-ol) e G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) se destaca dos demais grupos e essas diferenças demonstraram-se estatisticamente significantes quando comparadas com o G2 (4-NQO, $P<0,01$). Este último apresentou perda de peso e redução ($P<0,01$) no consumo de ração (não estatisticamente significativo) comparado aos outros grupos estudados.

Também é possível observar que o G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) esboçou uma mudança na curva de peso a partir da 15ª semana, porém não foi observada diferença estatisticamente significativa (Figura 4).

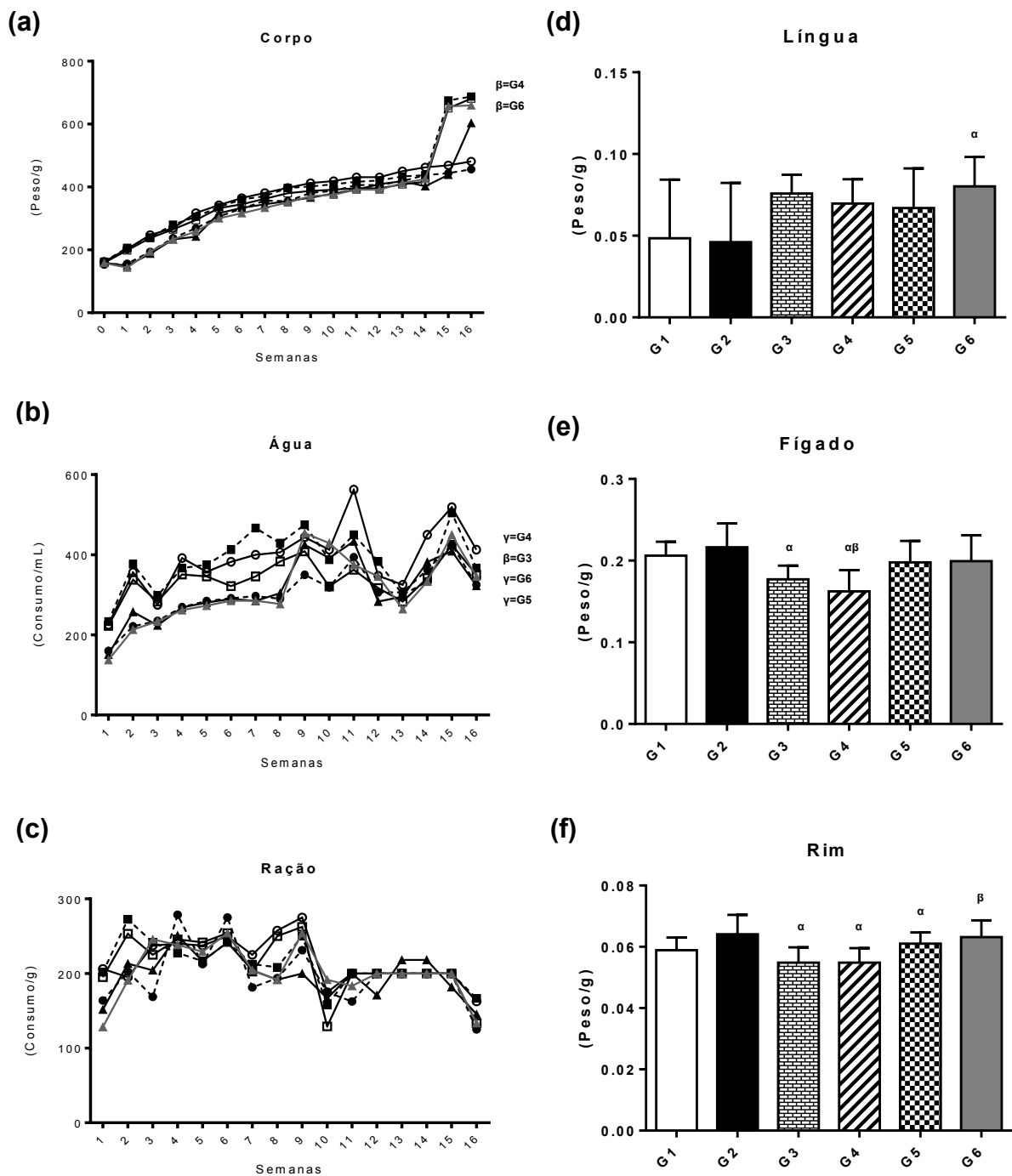
Para o consumo de água, os G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) e G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) demonstraram aumento estatisticamente significativo de consumo de água quando comparados com o G2 (4-NQO, $P<0,0001$)(Figura 4).

Já para as análises dos pesos dos órgãos, o G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) demonstrou maiores pesos médio das línguas quando comparado com o G2 (4-NQO, $P<0,05$), mas é conveniente salientar que as médias dos pesos das línguas nesse último grupo de animais também foi menor que o G1 (ratos saudáveis, $P<0,05$) (Figura 4).

Quando analisamos os pesos médios dos fígados, o G4 (menor dose TP-4-ol) demonstrou menor média de peso ($P<0,01$) comparado ao G1 (ratos saudáveis) e G2 (4-NQO). Já o G3 (maior dose TP-4-ol) apresentou menor média de peso do fígado que o grupo G2 (4-NQO, $P<0,01$) (Figura 4).

Para as médias de pesos dos rins, o G3 (maior dose TP-4-ol), G4 (menor dose TP-4-ol), G5 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) e G6 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) apresentaram menores médias de pesos que o G2 (4-NQO, $P < 0,05/0,01$) (Figura 4).

Figura 4 – Distribuição dos parâmetros biométricos segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental dos $\square$ / $\blacksquare$ G1 (ratos saudáveis), $\bullet$ / $\blacksquare$ G2 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO), $\square$ / $\blacksquare$ G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol), $\square$ / $\blacksquare$ G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol), $\square$ / $\blacksquare$ G5 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e $\square$ / $\blacksquare$ G6 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Acompanhamento do peso corporal/semana; **(b)** consumo de água/semana; **(c)** consumo de ração/semana; **(d)** peso da língua; **(e)** peso do fígado; e **(f)** peso do rim dos grupos experimentais após 16 semanas. Os resultados estão expressos em média (barras) e desvio-padrão (linhas verticais), analisados por ANOVA (One-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (α =p<0,05; β =p<0,01; e γ =p<0,0001).



Fonte: Autoria própria.

5.2 Análise de parâmetros bioquímicos

Os resultados bioquímicos foram descritos na figura 5. Podemos observar que o G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) demonstrou redução estatisticamente significativa nas concentrações das dosagens bioquímicas de ALT ($P<0,05/0,01$), ALP ($P<0,01/0,0001$) e creatinina ($P<0,05/0,0001$) quando comparado com o G2 (4-NQO).

O G4 (menor dose TP-4-ol) e G1 (ratos saudáveis) apresentaram reduções nas concentrações de ALT ($P<0,05/0,01$) e uréia ($P<0,05/0,0001$) comparados aos outros grupos G2, G3, G5 e G6, porém o G4 apresentou aumento em creatinina ($P<0,05$) e ALP ($P<0,05/0,0001$), comparado ao G1 (ratos saudáveis). Por outro lado, o G3 (maior dose TP-4-ol) e o G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) demonstraram aumento nas concentrações de ALT ($P<0,05$), ALP ($P<0,05/0,01/0,0001$), ureia ($P<0,05/0,0001$) e creatinina ($P<0,01/0,0001$) quando comparados com o G1 (ratos saudáveis). Estes resultados ficam mais evidentes quando comparamos o G3 (maior dose TP-4-ol) com o G2 (4-NQO), pois o G3 demonstrou maior média de ALP que G2 (4-NQO, $P<0,05$) (Figura 5).

Sendo assim, considerando nossos resultados observados pudemos verificar que, em relação ao AST, todos os grupos demonstraram padrões semelhantes de concentração plasmática. Em relação ao ALT, G2, G3 e G5 apresentaram maiores concentrações plasmáticas, denotando efeito tóxico da maior concentração de TP-4-ol e da prévia exposição ao 4-NQO. Entretanto, não observamos efeito aditivo no grupo G5. Além disso, o grupo G4 (menor dose TP-4-ol), demonstrou capacidade de reduzir as concentrações plasmáticas de ALT evidenciadas no grupo G2 (4-NQO).

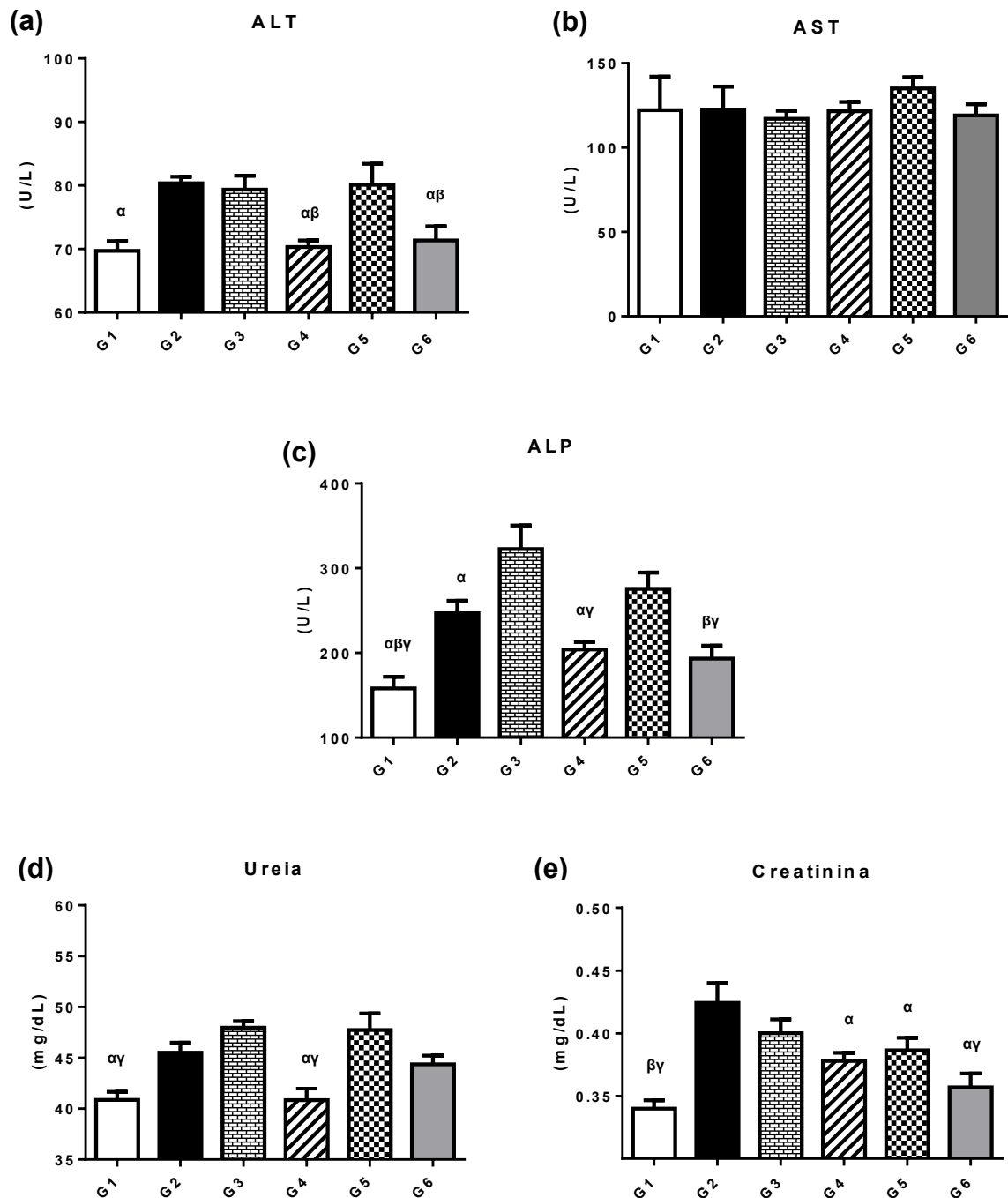
Para a enzima ALP, verificamos aumento em todos os grupos experimentais, mas o G3 (maior dose TP-4-ol) e o G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) demonstraram maiores concentrações. Por outro lado, aparentemente, a menor dose de TP-4-ol, embora tenha aumentado a concentração plasmática quando aplicada isoladamente, reduziu os efeitos propiciados pela prévia exposição ao 4-NQO, uma vez que as concentrações plasmáticas de G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) foram inferiores as observadas em G2 (4-NQO).

A uréia, de maneira semelhante, demonstrou maiores concentrações nos grupos G2, G3, G5 e G6. Mas o grupo G4 (menor dose TP-4-ol) demonstrou resultados semelhantes aos obtidos em G1 (ratos saudáveis). Mais uma vez, a

menor concentração de TP-4-ol demonstrou redução dos efeitos observados no grupo G2.

A creatinina, do mesmo modo, demonstrou maiores concentrações em todos os grupos estudados, exceto o G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol). O grupo G2 (4-NQO) demonstrou maiores concentrações que todos os demais grupos. Mas o G3 (maior dose TP-4-ol) também demonstrou grande aumento nessa enzima. Mais uma vez, a menor concentração de TP-4-ol parece ter reduzido os efeitos da previa exposição ao 4-NQO.

Figura 5 – Distribuição de dosagens bioquímicas no plasma sanguíneo após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental dos  G1 (ratos saudáveis),  G2 (ratos hepatopatas e nefropatas/4-NQO),  G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol),  G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol),  G5 (ratos hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e  G6 (ratos hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). (a) concentração de ALT; (b) concentração de AST; (c) concentração de ALP; (d) concentração de ureia; e (e) concentração de creatinina. Os resultados estão expressos em média (barras) e desvio-padrão (linhas verticais), analisados por ANOVA (One-Way) com pós-teste de Newman-Keuls por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas ($\alpha=p<0,05$; $\beta=p<0,01$; e $\gamma=p<0,0001$).



Fonte: Autoria própria.

5.3 Análise de parâmetros macroscópicos

A distribuição geral das lesões nas diferentes regiões da língua foram apresentadas na figura 6. Já os resultados das análises de presença de lesões fundamentais, por grupo, foram estão descritos na tabela 1. Nesta tabela é possível verificar os resultados de distribuição das lesões fundamentais (presença, localização, tipos e tamanho) e dos órgãos (tamanho).

Os resultados das análises de lesões fundamentais demonstram que G2 (4-NQO) e G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) apresentaram maior número de lesões ($P < 0,0001$) que o G1 (ratos saudáveis), G3 (maior dose TP-4-ol) e G4 (menor dose TP-4-ol) (Tabela 1).

Quanto à localização, os grupos G2, G5 e G6 apresentaram maior número de lesões no dorso da língua que os grupos G1, G3 e G4 ($P < 0,01/0,001$). Por outro lado, quando comparamos os grupos com maiores números de lesões, o G6 demonstrou menor número de lesões que os grupos G2 e G5 ($P < 0,01/0,001$) (Tabela 1).

Mais uma vez como esperado, na região posterior da língua, os ratos dos grupos G2, G5 e G6 apresentaram maior número de lesões que os ratos dos grupos G1, G3 e G4 ($P < 0,05/0,01/0,001$). Mas, o grupo G6 demonstrou menor número de lesões que o grupo G5 ($P < 0,05/0,01/0,001$) (Tabela 1).

Na posição mediana, os grupo G2 e G5 apresentaram maior número de lesões que os grupos G1, G3, G4 e G6 ($P < 0,05/0,001$) (Figura 7 e Tabela 1).

Na análise do tipo de lesão fundamental, os grupos G2 e G5 apresentaram maior número de placas brancas que os grupos G1, G3, G4 e G6 ($P < 0,01/0,0001$) (Figura 7 e Tabela 1).

Quando avaliamos o volume das lesões fundamentais, no seu total ($P < 0,05$) e em relação às placas brancas ($P < 0,0001$), o grupo G2 apresentou maior média de tamanho que os grupos G1, G3, G4, G5 e G6 (Tabela 1).

Para análise dos tamanhos médios dos órgãos, na média dos tamanhos das línguas nos diferentes grupos, G2, G3, G4, G5 e G6 apresentaram maiores médias que o grupo de ratos saudáveis (G1) ($P < 0,05/0,01/0,001$) (Tabela 1).

Para os fígados, G3, G4 e G6 apresentaram maiores volumes que o grupo G1 (Tabela 1).

Figura 6 – Distribuição das lesões fundamentais de todos os grupos experimentais sobre os desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* machos, após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. **(a)** Localização na face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A	2	1	3	6
M	3	6	4	13
P	16	30	26	72
TOTAL	21	37	33	91

(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A	0	0	0	0
M	1	0	0	1
P	0	0	0	0
TOTAL	1	0	0	1

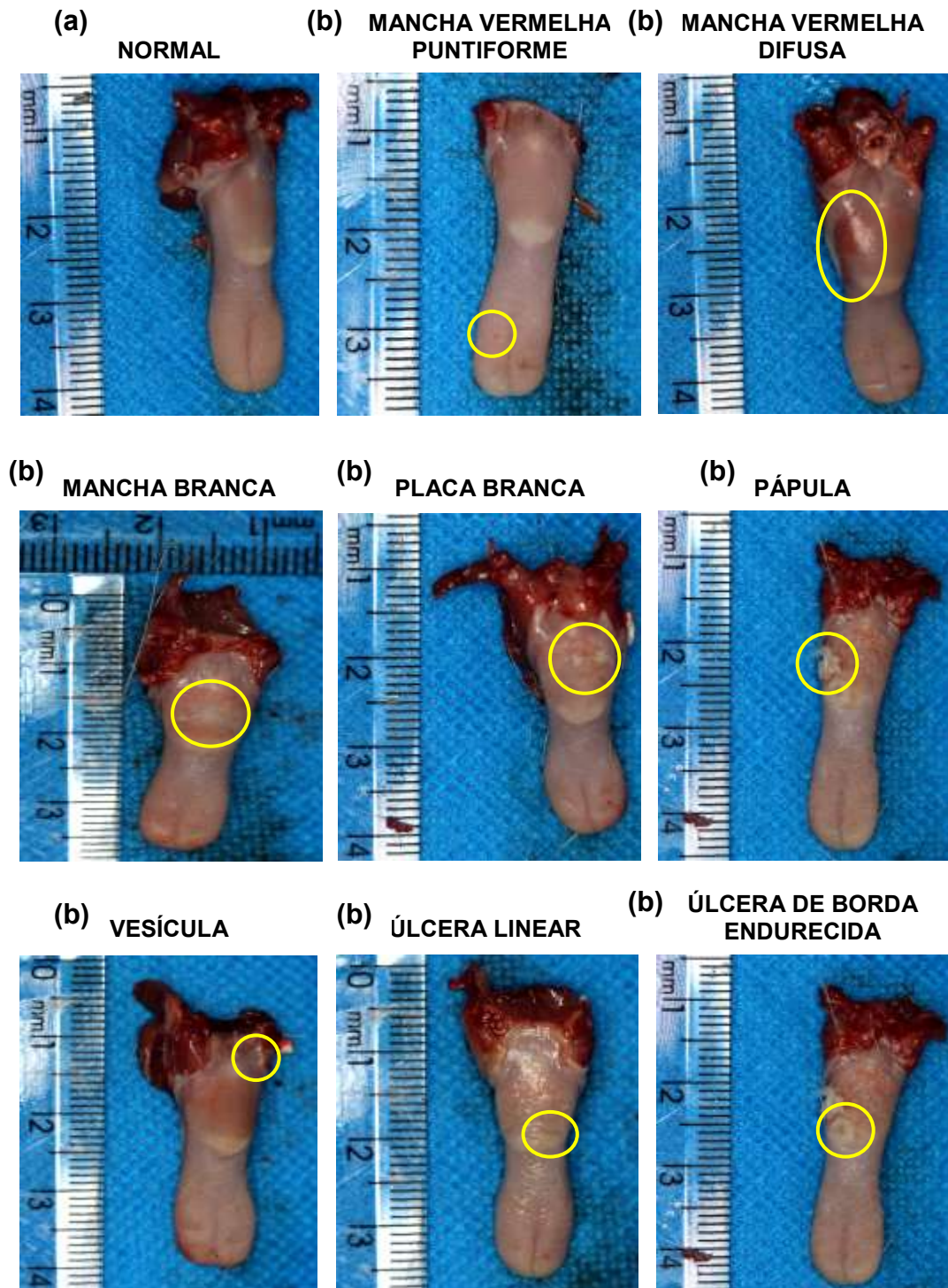
(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA

DIREITA									
A			M			P	TOTAL		
D	Md	E	D	Md	E	D		Md	E
0 0 0			0 1 0			1 0 1			3
TOTAL			0			1			2
									3

ESQUERDA									
P			M			A	TOTAL		
E	Md	D	E	Md	D	E		Md	D
1 0 1			1 1 0			0 0 0			4
TOTAL 2			2			0			4

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 – Distribuição das fotografias de lesões fundamentais no centro do círculo amarelo sobre a língua após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. (a) Língua de rato saudável e (b) Línguas de ratos oncológicos por 4-NQO.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 – Distribuição de lesões fundamentais da língua (presença, localização, tipos e volume) e dos órgãos (volume) após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental.

Lesões Fundamentais	Grupos (M±DP/T)					
	G1 (n=8)	G2 (n=8)	G3 (n=12)	G4 (n=12)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
*Presença	0,25±0,70/2	3,75±1,98/30 ^y	0,33±0,65/4	0,33±0,49/4	3,27±1,95/36 ^y	1,91±1,73/23
Localização						
Face						
Dorso	0	3,50±2,00/28 ^B	0,08±0,28/1	0,25±0,45/3	3,27±1,95/36 ^B	1,66±1,82/20 ^{By}
Borda lateral	0,12±0,35/1	0,25±0,46/2	0,25±0,45/3	0,08±0,28/1	0	0,25±0,62/3
Ventre	0,12±0,35/1	0	0	0	0	0
Região						
Anterior	0	0,37±1,06/3	0,08±0,28/1	0,08±0,28/1	0	0,08±0,28/1
Média	0,25±0,70/2	0,25±0,46/2	0,25±0,45/3	0	0,36±0,92/3	0,58±1,24/7
Posterior	0	3,12±1,12/25 ^y	0	0,25±0,45/3	2,90±1,97/33 ^y	1,25±1,28/15 ^{By}
Posição						
Direita	0,12±0,35/1	0,37±1,06/3	0,08±0,28/1	0	1,00±2,00/11	0,66±1,43/8
Mediana	0	2,87±2,58/23 ^y	0	0	1,09±0,83/12 ^a	0,33±0,65/4
Esquerda	0,12±0,35/1	0,50±1,06/4	0,25±0,45/3	0,33±0,49/4	1,18±1,16/13	0,91±1,44/11
Tipos						
Mancha vermelha puntiforme	0	0	0,16±0,38/2	0,16±0,38/2	0	0,16±0,38/2
Mancha vermelha difusa	0,25±0,70/2	0,25±0,46/2	0,16±0,38/2	0,08±0,28/1	0,09±0,30/1	0
Mancha branca	0	0	0	0	0,63±1,56/7	0,33±1,15/4
Placa branca	0	1,87±1,12/15 ^y	0	0	1,45±1,75/16 ^{By}	0,58±1,44/8
Pápula	0	0,50±0,75/4	0	0	0,72±1,00/8	0,25±0,62/3
Vesícula	0	0	0	0,08±0,28/1	0	0
Úlcera linear	0	0,62±0,76/5	0	0	0,18±0,40/2	0,41±0,51/5
Úlcera de borda endurecida	0	0,50±0,53/4	0	0	0,18±0,60/2	0,08±0,28/1
Tamanho (mm³)						
Total	0,002±0,009 /0,030	0,03±0,05 /0,751 ^a	0,002±0,005 /0,032	0,0003±0,0006 /0,046	0,009±0,01 /0,110	0,005±0,005 /0,061
Mancha vermelha puntiforme	0	0	0,0004±0,01 /0,005	0,002±0,01 /0,003	0	0,0007±0,002 /0,008
Mancha vermelha difusa	0,002±0,009 /0,030	0,004±0,01 /0,048	0,002±0,005 /0,027	0,004±0,01 /0,035	3,33±0,001 /0,004	0
Mancha branca	0	0	0	0	2,18±0,001 /0,002	0,0003±0,001 /0,004
Placa branca	0	0,04±0,07 /0,587 ^y	0	0	0,002±0,002 /0,02	0,001±0,005 /0,02
Pápula	0	0,003±0,009 /0,04	0	0	0,005±0,01 /0,05	0,0009±0,002 /0,01
Vesícula	0	0	0	0,0007±0,002 /0,008	0	0
Úlcera linear	0	0,002±0,006 /0,020	0	0	4,16±0,001 /0,005	0,0008±0,001 /0,009
Úlcera de borda endurecida	0	0,002±0,006 /0,056	0	0	4,16±0,001 /0,02	0,0008±0,001 /0,009
Tamanho (mm³) dos Órgãos						
Língua	9,09±2,24 /72,72 ^{aBy}	6,19±2,20 /49,55	4,94±1,01 /59,36	6,16±1,45 /73,94	5,19±1,55 /57,15	5,60±1,66 /67,24
Fígado	20,93±17,57 /251,1 ^B	19,39±15,54 /232,7	22,55±10,06 /270,6	22,67±8,32 /272,1	23,52±13,03 /282,2	22,25±6,96 /267,0
Rim	3,25±0,89 /26,04	3,49±1,16 /27,99	4,05±0,99 /48,69	2,72±0,37 /32,68	4,29±2,83 /47,27	3,91±1,52 /46,97

G1 (ratos saudáveis), G2 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol), G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol), G5 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua, hepatopatas e nefropatas/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^ap<0,05; ^Bp<0,01; e ^yp<0,0001).

Fonte: Autoria própria.

5.4 Análise de parâmetros microscópicos

5.4.1 Língua

Os resultados das análises histopatológicas das línguas nos diferentes grupos estão descritos na figura 8. Os grupos G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) e G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) apresentaram menor número de lesões histopatológicas que o grupo G2 (4-NQO), estatisticamente significativa ($P < 0,0001/0,01$).

Na análise das localizações das alterações histopatológicas, os grupos G5 e G6 apresentaram menor número que o grupo G2 no dorso ($P < 0,0001$), região anterior ($P < 0,05$) e posição esquerda ($P < 0,05/0,01$). Mas o grupo G6 também apresentou menor número de lesões que o grupo G2 na região direita ($P < 0,05$) (Figura 8 e tabela 2).

Quanto as análises específicas de tipos de lesões, o grupo G5 apresentou menor número de hiperplasias epiteliais que os grupos G2 ($P < 0,0001$) e G6 (0,05). A localização das hiperplasias no G5 apresentou-se em menor número que o grupo G2 no dorso ($P < 0,0001$) e na posição esquerda em relação ao G2 ($P < 0,0001$) e G6 ($P < 0,05$).

Para a presença de lesões displásicas, os grupos G5 ($P < 0,05$) e G6 ($P < 0,0001$) apresentaram menores quantidades que o grupo G2. Mas, o grupo G6 também demonstrou redução do número de lesões displásicas em relação ao grupo G5 ($P < 0,01$), especificamente, em relação displasia moderada observamos redução significativa ($P < 0,0001$) no grupo G6 em relação ao grupo G2 ($P < 0,0001$). Em relação à localização das displasias, os grupos G5 e G6 apresentaram menor número de lesões displásicas na região do dorso, quando comparados com o grupo G2 ($P < 0,0001$). Mas o grupo G6, apresentou menor número lesões displásicas no dorso ($P < 0,0001$) e na região posterior ($P < 0,01$) em relação ao grupo G5. Do mesmo modo, o grupo G6 também demonstrou menor número de lesões displásicas que o grupo G2 nas regiões anterior ($P < 0,01$), média ($P < 0,01$) e posição direita ($P < 0,05$) e esquerda ($P < 0,0001$). Esta última, também sendo menor que o grupo G5 ($P < 0,05$).

A presença de displasia leve na região de dorso foi reduzida em 100% no grupo G6, sendo estatisticamente diferente nos grupo G2 ($P < 0,01$) e G5 ($P < 0,05$). Do mesmo modo, a displasia moderada também demonstrou redução em número no

grupo G6 em relação aos grupos G2 e G5 no dorso ($P<0,0001/0,01$) e posição esquerda ($P<0,0001/0,05$). Mas o grupo G5 também demonstrou redução do número de displasias moderadas na região do dorso em relação ao grupo G2 ($P<0,01$) (Figura 9 e Tabela 2).

Quando complementamos os dados relativos às análises de displasia por meio da análise do risco de malignização, observamos baixo risco de malignização nas displasias moderadas do grupo G6 quando comparadas com os grupos G2 ($P<0,0001$) e G5 ($P<0,05$). O mesmo grupo G5 apresentou menor risco de malignização quando comparado com o grupo G2 ($P<0,05$). Quanto a localização das displasias moderadas de baixo risco, o grupo G6 apresentou menor número de lesões no dorso em relação ao grupo G2 ($P<0,0001$) e G5 ($P<0,05$). Do mesmo modo, o grupo G5 apresentou menor número de lesões quando comparado com o grupo G2 ($P<0,01$). Já na posição direita, os grupos G6 ($P<0,0001$) e G5 ($P<0,01$) demonstraram menores menor número de lesões displásicas moderadas de baixo risco quando comparadas com o grupo G2. Por fim, o grupo G6 demonstrou menor número desse tipo de lesão na posição esquerda em relação ao grupo G5 ($P<0,05$) (Figura 9 e 10; Tabela 3).

Estes resultados foram evidenciados com redução de alterações histológicas do tipo arquitetônicas e citológicas.

Especificamente em relação às alterações arquitetônicas, o grupo G6 demonstrou menor quantidade de perda de polaridade das células basais quando comparado ao grupo G5 ($P<0,01$), cristas epiteliais em forma de gota quando comparado aos grupos G2 ($P<0,0001$) e G5 ($P<0,05$) e o número de figuras de mitoses atípicas em relação ao grupo G2 ($P<0,05$), com redução de 100% das duas últimas alterações.

Na análise das alterações citológicas, o grupo G6 demonstrou menor quantidade de anisonucleose (redução de 100%) quando comparado com o grupo G2 ($P<0,0001$) e com grupo G5 ($P<0,05$). Entretanto, mais uma vez o grupo G5 também demonstrou redução da quantidade de anisonucleose em relação ao grupo G2 ($P<0,05$). Para a quantificação de pleomorfismo nuclear o grupo G6 apresentou menores quantidades que o grupo G2 ($P<0,05$).

Especificamente em relação às análises de presença de lesões malignas, nossos resultados, mais uma vez, demonstraram maior efetividade no grupo G6. De fato, o grupo G6 demonstrou redução estatisticamente significativa na média de

número de lesões malignas em relação aos grupos G2 e G5 ($P < 0,05$), reduzindo, especificamente em relação ao grupo G2 (4-NQO), a média de 2,62 para 0,75 lesões malignas por animal do grupo (Tabela 4). O mesmo aconteceu na região de maior acometimento de lesões malignas na língua de ratos tratados com 4-NQO. O dorso também demonstrou redução estatisticamente significativa da média de lesões malignas diagnosticadas ($P < 0,0001$).

Quando analisamos a presença de carcinomas invasivos, o grupo G6 demonstrou menor número que o grupo G2 ($P < 0,05$). Esses tumores invasivos foram reduzidos em número no dorso, região anterior e posição esquerda da língua dos ratos do grupo G6 tanto em relação ao grupo G2 ($P < 0,0001$) quanto em relação ao grupo G5 ($P < 0,01$) (Figura 11).

Quando subdividimos essa análise por grau de invasão dos carcinomas (in situ, micro invasivo, invasivo e profundamente invasivo), identificamos redução de carcinoma in situ no dorso da língua dos animais dos grupos G6 (100%, $P < 0,0001$) e G5 (40%, $P < 0,05$) em relação ao grupo G2, e na região anterior e posição direita, no grupo G6 em relação ao G2 ($P < 0,05$). Os carcinomas micro-invasivos nos ratos do G6 apresentaram redução de mais de 70% no dorso ($P < 0,0001$), região média ($P < 0,05$) e posição esquerda ($P < 0,05$) quando comparadas com o grupo G2. Além disso, o grupo G6 também demonstrou redução do número médio de carcinomas micro-invasivos na posição direita em relação ao grupo G5 ($P < 0,05$). Para os carcinomas invasivos, mais uma vez o grupo G6 apresentou resultados expressivos. Esse grupo de animais demonstrou redução de 80% desse tipo de carcinoma na região de dorso ($P < 0,0001$) e região posterior ($P < 0,05$) quando comparado com o grupo G5 (Figura 12 e Tabela 4).

Após analisarmos a presença, localização e grau de invasão dos carcinomas, passamos a analisar o tipo e intensidade do infiltrado inflamatório nos processos neoplásicos malignos. Mais uma vez observamos que o grupo G6 demonstrou distinção em relação aos grupos G2 e G5. A média de presença de infiltrados inflamatórios no carcinoma de língua indicou redução do número ($P < 0,0001/0,05$) no G6 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) em relação ao G2 (ratos oncológicos de língua) e G5 (ratos oncológicos de língua tratados com a maior dose de TP-4-ol), além de reduzir em 100% ($P < 0,05$) o infiltrado inflamatório do carcinoma in situ no G6 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) comparado ao G2 (ratos oncológicos de língua). Quanto à localização no

dorso do infiltrado inflamatório no carcinoma de língua, apresentou redução ($P<0,0001/0,05$) do número no G6 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) em relação ao G2 (ratos oncológicos de língua) e G5 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) e apenas G6 comparado ao G2 ($P<0,05$) na posição esquerda. As localizações no dorso ($P<0,0001$), região anterior ($P<0,0001/0,05$) e posição direita ($P<0,0001/0,01$) do infiltrado inflamatório no carcinoma in situ demonstraram redução no G6 de 100% (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) e G5 (ratos oncológicos de língua tratados com a maior dose de TP-4-ol) em relação ao G2 (ratos oncológicos de língua). As localizações no dorso ($P<0,01$), região média ($P<0,01$) e posição esquerda ($P<0,05$) do infiltrado inflamatório no carcinoma micro-invasivo demonstrou redução no G6 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) comparado ao G2 (ratos oncológicos de língua), além do G5 (ratos oncológicos de língua tratados com a maior dose de TP-4-ol) também reduzir em 100% ($P<0,01$) na posição esquerda comparado ao G2 (ratos oncológicos de língua). As localizações no dorso ($P<0,01$) e região posterior ($P<0,05$) do infiltrado inflamatório no carcinoma invasivo apresentou redução no G6 (ratos oncológicos de língua tratados com a menor dose de TP-4-ol) comparado ao G5 (ratos oncológicos de língua tratados com a maior dose de TP-4-ol) (Figura 13).

O grupo G6 apresentou redução da intensidade do processo inflamatório discreto e moderado, entretanto, apenas na intensidade moderada essa redução foi estatisticamente significativa em relação ao grupo G2 ($P<0,05$). Essa redução de intensidade foi também observada no tipo in situ de carcinoma, onde os grupos G6 e G5 apresentaram inflamação moderada menor que o grupo G2 ($P<0,0001$). Nos outros graus de invasão (micro-invasivo, invasivo e profundamente invasivo) não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na análise de intensidade do infiltrado inflamatório.

Em relação ao tipo de resposta inflamatória, o grupo G6 demonstrou redução do processo inflamatório crônico ($P<0,0001$) em relação aos grupos G2 ($P<0,01$) e G5 ($P<0,05$). O mesmo foi observado em relação ao carcinoma in situ e carcinoma micro-invasivo quando comparado com o grupo G2 ($P<0,01/0,05$).

Por fim, o dorso ($P<0,0001$), a região posterior ($P<0,05$) e posição esquerda ($P<0,05$) dos carcinomas do grupo G6 demonstraram redução em relação aos grupos G2 e G5. Já na análise do infiltrado inflamatório subagudo no carcinoma

lingual em relação à localização, o grupo G5 demonstrou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo G2 na região média ($P < 0,05$) (Figura 14 e Tabela 5).

Figura 8 – Distribuição das alterações histopatológicas sobre os desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* machos, após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental do G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Localização na face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A				
G2=8	0	7		15
G5=4	0	4		8
G6=4	0	5		9
M				
G2=7	0	8		15
G5=6	0	6		12
G6=7	0	7		14
P				
G2=2	1	6		9
G5=5	0	7		12
G6=1	0	5		6
TOTAL	44	1	55	100

(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A				
G2=0	0	0		0
G5=0	0	0		0
G6=0	0	0		0
M				
G2=0	0	0		0
G5=0	0	0		0
G6=0	0	0		0
P				
G2=0	0	0		0
G5=0	0	0		0
G6=0	0	0		0
TOTAL	0	0	0	0

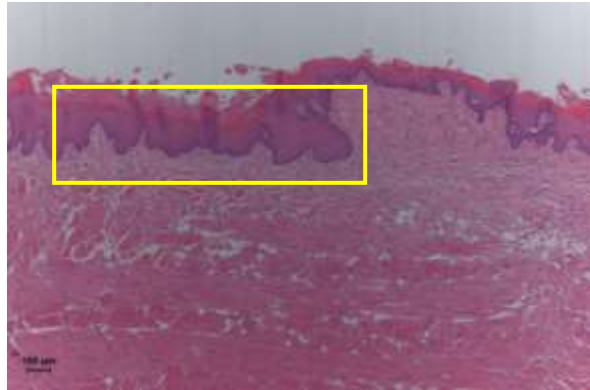
(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA

DIREITA										ESQUERDA									
A			M			P			TOTAL	P			M			A			TOTAL
D	Md	E	D	Md	E	D	Md	E		E	Md	D	E	Md	D	E	Md	D	
G2=0			0	0	0	0	0	0	0	0	G2=0			0	0	0	0	0	0
G5=0			0	0	0	0	0	0	0	0	G5=0			0	0	0	0	0	0
G6=0			0	0	0	0	0	0	0	0	G6=0			0	0	0	0	0	0
TOTAL			0			0				0	TOTAL			0			0		0

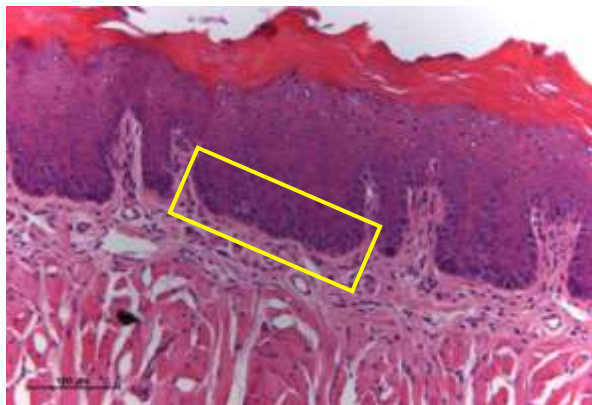
Fonte: Autoria própria.

Figura 9 – Distribuição das fotomicrografias das alterações histopatológicas e displasia moderada de baixo risco de malignização após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. **(a)** Alterações histopatológicas do G2 (ratos oncológicos/4-NQO). **(b)** Alterações arquitetônicas – perda da polaridade das células basais (círculo), cristas epiteliais em forma de gota e aumento do número de figuras de mitoses atípicas (quadrado). E alterações citológicas – anisonucleose e pleomorfismo nuclear (quadrado).

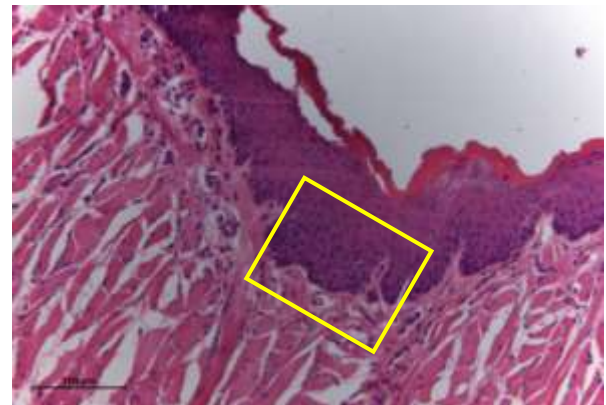
(a) HIPERPLASIA (H&E/100x)



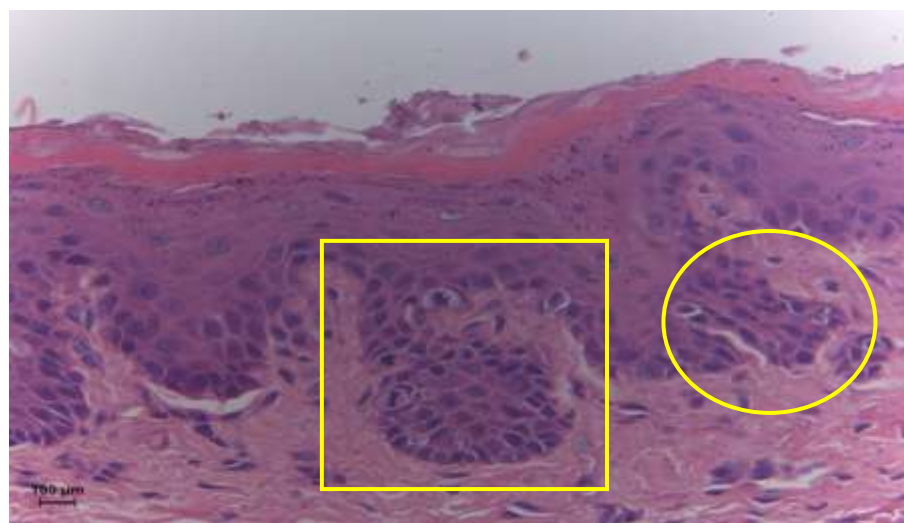
(a) DISPLASIA LEVE (H&E/200x)



(a) DISPLASIA MODERADA (H&E/200x)



(ab) DISPLASIA MODERADA DE BAIXO RISCO DE MALIGNIZAÇÃO (H&E/400x)



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Distribuição das alterações histopatológicas após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Continua**).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
*Presença	4,87±0,83/39	2,90±1,51/32 ^B	2,41±1,31/29 ^Y
Localização			
Face			
Dorso	4,87±0,83/39	2,90±1,51/32 ^Y	2,41±1,31/29 ^Y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	1,87±0,99/15	0,72±0,78/8 ^a	0,75±0,75/9 ^a
Média	1,87±0,99/15	1,09±1,22/12	1,16±0,93/14
Posterior	1,12±0,99/9	1,09±1,13/12	0,50±0,67/6
Posição			
Direita	2,12±1,12/17	1,36±1,28/15	1,00±1,20/12 ^a
Mediana	0,12±0,35/1	0	0
Esquerda	2,62±0,91/21	1,54±1,29/17 ^a	1,41±0,99/17 ^B
Tipos			
Hiperplasia	2,62±0,51/21	1,36±0,92/15 ^{ay}	2,00±1,34/24
Displasia	1,87±0,64/15	1,09±0,83/12 ^a	0,16±0,38/2 ^{By}
Displasia leve	0,37±0,74/3	0,27±0,46/3	0
Displasia moderada	1,37±0,91/11	0,72±0,78/8	0,16±0,38/2 ^Y
Displasia grave	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Papiloma	0,37±0,51/3	0,45±0,68/5	0,25±0,45/3
Localização/Tipos			
Hiperplasia			
Face			
Dorso	2,62±0,51/21	1,36±0,92/15 ^Y	2,00±1,34/24
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	1,00±0,53/8	0,27±0,46/3	0,58±0,66/7
Média	1,12±0,64/9	0,45±0,68/5	0,91±0,90/11
Posterior	0,62±0,51/4	0,63±0,50/7	0,50±0,67/6
Posição			
Direita	0,87±0,83/7	0,72±0,78/8	0,66±0,98/8
Mediana	0,12±0,35/1	0	0
Esquerda	1,62±0,91/13	0,63±1,02/7 ^{ay}	1,33±0,98/16
Displasia			
Face			
Dorso	1,87±0,64/15	1,09±0,83/12 ^Y	0,16±0,38/2 ^Y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,75±0,70/6	0,27±0,46/3	0,08±0,28/1 ^B
Média	0,75±0,88/6	0,36±0,50/4	0,08±0,28/1 ^B
Posterior	0,37±0,51/3	0,45±0,68/5	0 ^a
Posição			
Direita	0,75±0,70/6	0,36±0,67/4	0,08±0,28/1 ^B
Mediana	0	0	0
Esquerda	1,12±0,99/9	0,72±0,46/8	0,08±0,28/1 ^{By}
Displasia Leve			
Face			
Dorso	0,37±0,74/3	0,27±0,46/3	0 ^{aB}
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,25±0,46/2	0	0
Média	0,12±0,35/1	0,18±0,40/2	0
Posterior	0	0,09±0,30/1	0
Posição			
Direita	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,25±0,70/2	0,18±0,40/2	0

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^B=p<0,01; e ^Y=p<0,0001).

Tabela 2 – Distribuição das alterações histopatológicas após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Conclusão**).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Displasia Moderada			
Face			
Dorso	1,37±0,91/11	0,72±0,78/8 ^B	0,16±0,38/2 ^{BY}
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,50±0,53/4	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Média	0,50±0,75/4	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Posterior	0,37±0,51/3	0,36±0,67/4	0
Posição			
Direita	0,50±0,53/4	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,87±0,99/7	0,54±0,52/9	0,08±0,28/1 ^{ay}
Displasia Grave			
Face			
Dorso	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0	0,09±0,30/1	0
Média	0,12±0,35/1	0	0
Posterior	0	0	0
Posição			
Direita	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Mediana	0	0	0
Esquerda	0	0	0
Papiloma			
Face			
Dorso	0,37±0,51/3	0,45±0,68/5	0,25±0,45/3
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0,08±0,28/1
Média	0,12±0,35/1	0,27±0,64/3	0,08±0,28/1
Posterior	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0,08±0,28/1
Posição			
Direita	0,12±0,35/1	0,27±0,46/3	0,16±0,38/2
Mediana	0,12±0,35/1	0	0
Esquerda	0,12±0,35/1	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^B=p<0,01; e ^v=p<0,0001).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Distribuição da displasia moderada quanto ao risco de malignização após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental.

DISPLASIA MODERADA	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Risco de Malignização			
Baixo	1,37±0,91/11	0,72±0,78/8 ^y	0,16±0,38/2 ^{ay}
Alto	0	0	0
Alterações Arquitetônicas de Baixo Risco			
Estratificação epitelial irregular	0	0,18±0,40/2	0
Perda de polaridade das células basais	0,50±0,53/4	0,72±0,78/8	0,16±0,38/2 ^β
Cristas epiteliais em forma de gota	0,87±0,83/7	0,45±0,68/5	0 ^{ay}
Aumento do número de figuras de mitoses atípicas	0,50±0,53/4	0,27±0,46/3	0 ^a
Mitoses anômalas superficiais	0,12±0,35/1	0,18±0,40/2	0
Queratinização prematura em células isoladas	0	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais	0	0	0
Alterações Citológicas de Baixo Risco			
Anisonucleose	1,12±0,99/9	0,45±0,68/5 ^β	0 ^{ay}
Pleomorfismo nuclear	0,62±0,74/5	0,36±0,67/4	0,08±0,28/1 ^a
Anisocitose	0,12±0,35/1	0,18±0,40/2	0
Pleomorfismo celular	0	0,09±0,30/1	0
Aumento da proporção núcleo-citoplasma	0,25±0,46/2	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Aumento do tamanho nuclear	0,37±0,74/3	0	0
Figuras de mitoses atípicas	0,12±0,35/1	0,36±0,67/4	0
Aumento do número e tamanho de nucléolos	0,37±0,74/3	0,09±0,30/1	0
Hipercromatismo	0,50±0,53/4	0,45±0,68/5	0,16±0,38/2
Localização de Baixo Risco			
Face			
Dorso	1,37±0,91/11	0,72±0,78/8 ^β	0,16±0,38/2 ^{By}
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,50±0,53/4	0,27±0,46/3	0,08±0,28/1
Média	0,50±0,75/4	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Posterior	0,37±0,51/3	0,27±0,64/3	0
Posição			
Direita	0,87±0,99/7	0,18±0,40/2 ^β	0,08±0,28/1 ^y
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,50±0,53/4	0,54±0,52/6	0,08±0,28/1 ^a

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^β=p<0,01; e ^y=p<0,0001).

Fonte: Autoria própria.

Figura 10 – Distribuição da displasia moderada de baixo risco sobre os desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* machos, após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental do G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Localização na face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA					(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA				
	D	Md	E	TOTAL		D	Md	E	TOTAL
A					A				
G2=2		0	2	4	G2=0		0	0	0
G5=1		0	2	3	G5=0		0	0	0
G6=1		0	0	1	G6=0		0	0	0
M					M				
G2=2		0	1	3	G2=0		0	0	0
G5=1		0	1	2	G5=0		0	0	0
G6=0		0	1	1	G6=0		0	0	0
P					P				
G2=3		0	1	4	G2=0		0	0	0
G5=0		0	3	3	G5=0		0	0	0
G6=0		0	0	0	G6=0		0	0	0
TOTAL	10	0	11	21	TOTAL	0	0	0	0

(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA												
DIREITA						ESQUERDA						
A	M	P				P	M	A				
D Md E	D Md E	D Md E	D Md E	D Md E	D Md E	E Md D	E Md D	E Md D	E Md D	E Md D	E Md D	TOTAL
G2=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	G2=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G5=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	G5=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G6=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	G6=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
TOTAL	0	0	0	0	0	TOTAL	0	0	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

Figura 11 – Distribuição do carcinoma lingual sobre os desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* machos, após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental do G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Localização na face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

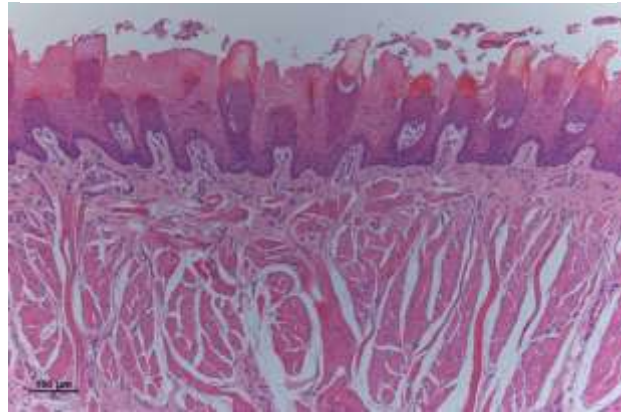
(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA					(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA				
	D	Md	E	TOTAL		D	Md	E	TOTAL
A					A				
G2=2		0	3	5	G2=0		0	0	0
G5=2		1	2	5	G5=0		0	0	0
G6=2		0	1	3	G6=0		0	0	0
M					M				
G2=4		0	4	8	G2=0		0	0	0
G5=4		0	3	7	G5=0		0	0	0
G6=3		0	1	4	G6=0		0	0	0
P					P				
G2=4		0	4	4	G2=0		0	0	0
G5=5		1	5	11	G5=1		0	0	1
G6=1		0	1	2	G6=0		0	0	0
TOTAL	27	2	24	53	TOTAL	1	0	0	1

(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA									
DIREITA					ESQUERDA				
A	M	P	TOTAL		P	M	A	TOTAL	
D Md E	D Md E	D Md E			E Md D	E Md D	E Md D		
G2=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G2=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G5=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G5=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G6=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G6=0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
TOTAL	0	0	0	0	TOTAL	0	0	0	0

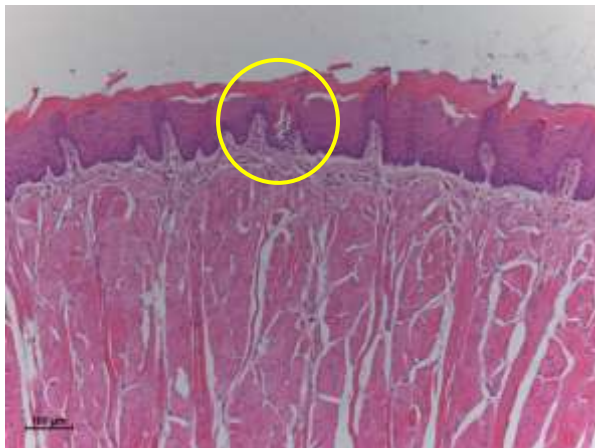
Fonte: Autoria própria.

Figura 12 – Distribuição das fotomicrografias da classificação de invasão tecidual (círculo) do carcinoma lingual (H&E/100x) após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. **(a)** G1 (ratos saudáveis). **(b)** G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO).

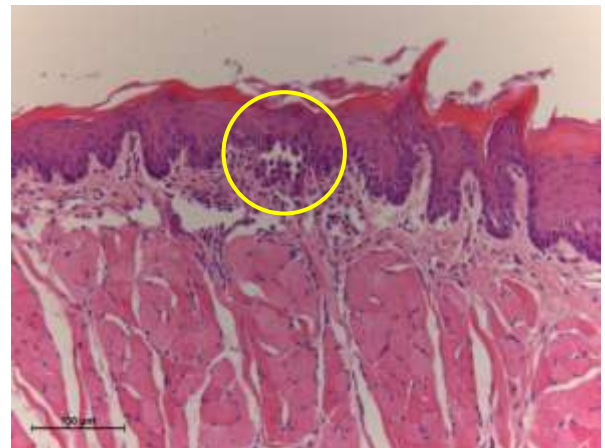
(a) NORMAL



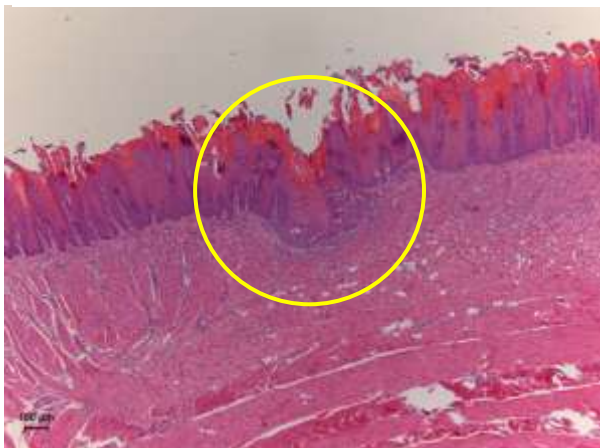
(b) CARCINOMA IN SITU



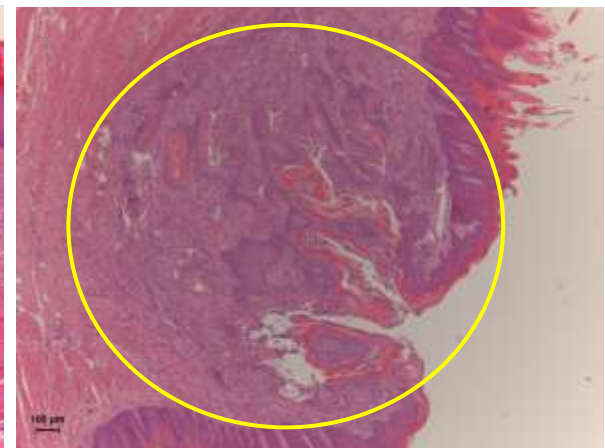
(b) CARCINOMA MICRO-INVASIVO



(b) CARCINOMA INVASIVO



(b) CARCINOMA PROFUNDAMENTE INVASIVO



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Distribuição microscópica do carcinoma lingual após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Continua**).

CARCINOMA LINGUAL	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
*Presença	2,62±1,59/21	2,18±1,72/24	0,75±1,05/9 ^a
Localização			
Face			
Dorso	2,62±1,59/21	2,09±1,57/23	0,75±1,05/9 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0,09±0,30/1	0
Região			
Anterior	0,62±0,74/5	0,45±0,68/5	0,25±0,45/3
Média	1,00±0,92/8	0,72±1,00/7	0,33±0,65/4
Posterior	1,00±0,53/8	1,00±1,18/12	0,16±0,57/2 ^b
Posição			
Direita	1,25±1,03/10	1,09±0,70/12	0,50±0,67/6
Mediana	0	0,18±0,40/2	0
Esquerda	1,37±1,18/11	0,90±1,22/10	0,25±0,45/3 ^b
Tipos			
In situ	0,62±0,74/5	0,27±0,64/3	0
Micro-invasivo	0,87±0,99/7	0,54±0,68/6	0,16±0,57/2
Invasivo	0,62±0,91/5	0,90±1,22/10	0,16±0,38/2 ^a
Profundamente invasivo	0,50±0,75/4	0,45±0,52/5	0,41±0,66/5
Localização/Tipos			
In Situ			
Face			
Dorso	0,62±0,74/5	0,27±0,64/3 ^a	0 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,37±0,74/3	0,18±0,60/2	0 ^a
Média	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Posterior	0,12±0,35/1	0	0
Posição			
Direita	0,37±0,51/3	0,18±0,40/2	0 ^a
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,25±0,46/2	0,09±0,30/1	0
Micro-invasivo			
Face			
Dorso	0,87±0,35/7	0,45±0,20/5	0,16±0,16/2 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0,09±0,09/1	0
Região			
Anterior	0	0,09±0,09/1	0,08±0,08/1
Média	0,62±0,26/5	0,36±0,20/4	0,08±0,08/1 ^a
Posterior	0,25±0,16/2	0,09±0,09/1	0
Posição			
Direita	0,37±0,26/3	0,54±0,20/6	0,08±0,08/1 ^a
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,50±0,26/4	0 ^a	0,08±0,08/1
Invasivo			
Face			
Dorso	0,62±0,91/5	0,90±1,22/10	0,16±0,38/2 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,25±0,46/2	0,18±0,40/2	0,08±0,28/1
Média	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Posterior	0,25±0,46/1	0,63±0,92/7	0,08±0,28/1 ^a
Posição			
Direita	0,37±0,74/3	0,27±0,43/3	0,08±0,28/1
Mediana	0	0,18±0,40/2	0
Esquerda	0,25±0,70/2	0,45±0,68/5	0,08±0,28/1

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^ap<0,05; ^bp<0,01; e ^yp<0,0001).

Tabela 4 – Distribuição microscópica do carcinoma lingual após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Conclusão**).

CARCINOMA LINGUAL	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Profundamente Invasivo			
Face			
Dorso	0,50±0,75/4	0,45±0,52/5	0,41±0,66/5
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0	0	0,08±0,28/1
Média	0,12±0,35/1	0,18±0,40/2	0,25±0,62/3
Posterior	0,37±0,51/3	0,27±0,46/3	0,08±0,28/1
Posição			
Direita	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0,33±0,49/4
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,37±0,51/3	0,36±0,50/4	0,08±0,28/1

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^b=p<0,01; e ^v=p<0,0001).

Fonte: Autoria própria.

Figura 13 – Distribuição do infiltrado inflamatório do carcinoma lingual sobre os desenhos esquemáticos da topografia da língua de ratos *Holtzman* machos, após a decapitação com 16 semanas segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental do G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Localização na face do dorso; **(b)** Face do ventre; e **(c)** Face da borda lateral. Todas as faces acompanhadas de região anterior (A), média (M) ou posterior (P) e posição direita (D), mediana (Md) ou esquerda (E).

(a) FACE DO DORSO DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A				
G2=4	0	4		8
G5=4	0	3		7
G6=4	0	2		6
M				
G2=7	0	6		13
G5=4	1	5		10
G6=4	0	3		7
P				
G2=7	0	6		13
G5=9	1	7		17
G6=4	0	0		4
TOTAL	47	2	36	85

(b) FACE DO VENTRE DA LÍNGUA

	D	Md	E	TOTAL
A				
G2=0	0	0		0
G5=0	0	0		0
G6=0	0	0		0
M				
G2=0	0	0		0
G5=0	0	0		0
G6=0	0	0		0
P				
G5=1	0	0		1
G5=1	0	0		1
G6=0	0	0		0
TOTAL	1	0	0	1

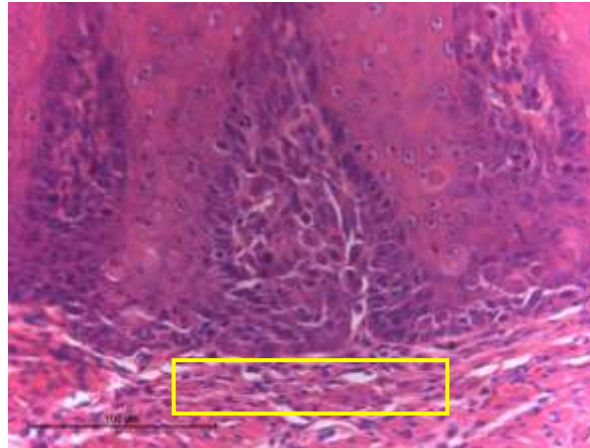
(c) FACE DA BORDA LATERAL DA LÍNGUA

DIREITA				ESQUERDA			
A	M	P	TOTAL	P	M	A	TOTAL
D Md E	D Md E	D Md E		E Md D	E Md D	E Md D	
G2=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G2=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G5=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G5=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
G6=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	G6=0 0 0	0 0 0	0 0 0	0
TOTAL 0	0	0	0	TOTAL 0	0	0	0

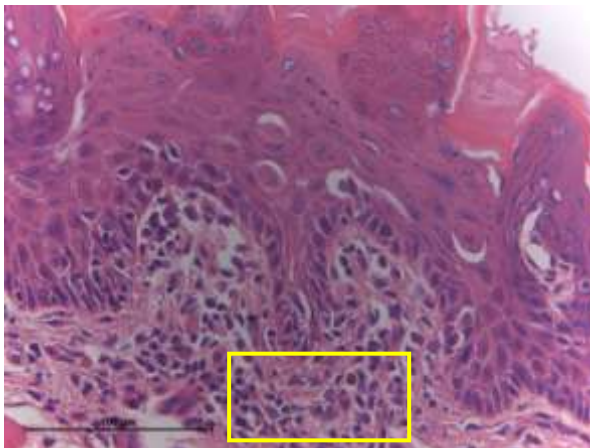
Fonte: Autoria própria.

Figura 14 – Distribuição das fotomicrografias dos infiltrados inflamatórios (quadrado) no carcinoma lingual (H&E/400x) após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. **(a)** G2 (ratos oncológicos de língua/4NQO); **(b)** Intensidade subaguda do infiltrado inflamatório com células polimorfonucleares; e **(c)** Intensidade crônica do infiltrado inflamatório com células monomorfonucleares.

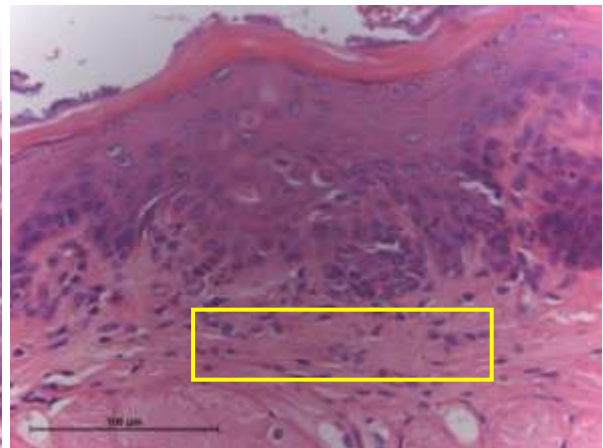
(a) INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO CARCINOMA IN SITU



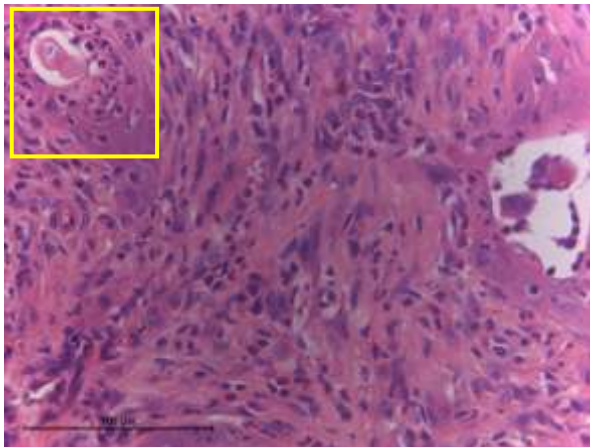
(a) INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO CARCINOMA MICRO-INVASIVO



(a) INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO CARCINOMA INVASIVO



(ab) INFILTRADO INFLAMATÓRIO SUBAGUDO NO CARCINOMA LINGUAL



(ac) INFILTRADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO NO CARCINOMA LINGUAL

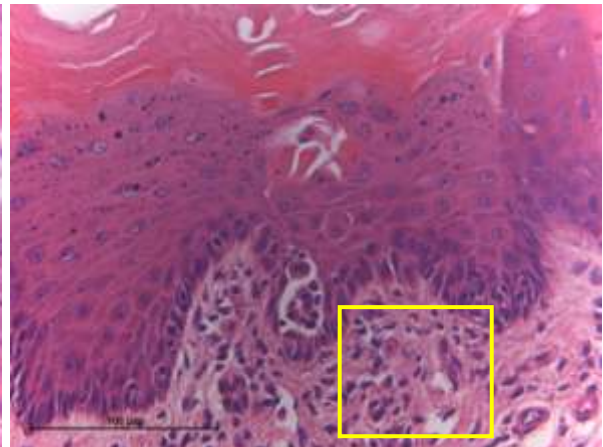


Tabela 5 – Distribuição do infiltrado inflamatório do carcinoma lingual após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Continua**).

INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Presença			
Carcinoma de língua	4,25±2,96/34	3,09±2,38/34	1,41±2,02/17 ^{ay}
Presença/Tipos			
In situ	1,12±1,35/9	0,27±0,64/3	0 ^y
Micro-invasivo	1,25±1,48/10	0,72±1,00/8	0,25±0,86/3
Invasivo	0,87±1,64/7	1,27±1,55/14	0,33±0,77/4
Profundamento invasivo	1,00±1,51/8	0,81±0,98/9	0,83±1,33/10
Localização			
Carcinoma de Língua			
Face			
Dorso	4,25±2,96/34	3,09±2,38/34	1,41±2,02/17 ^{by}
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	1,00±1,19/8	0,63±0,92/7	0,50±0,90/6
Média	1,62±1,76/13	0,90±1,37/10	0,58±1,24/7
Posterior	1,62±1,18/13	1,54±1,80/17	0,33±1,15/4
Posição			
Direita	2,25±2,18/18	1,54±1,03/17	1,00±1,34/12
Mediana	0	0,18±0,40/2	0
Esquerda	2,00±1,60/16	1,36±1,96/15	0,41±0,79/5 ^c
Localização/Tipos			
In Situ			
Face			
Dorso	1,12±1,35/9	0,27±0,64/3	0 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,75±1,16/6	0,18±0,60/2 ^a	0 ^y
Média	0,25±0,70/2	0,09±0,30/1	0
Posterior	0,12±0,35/1	0	0
Posição			
Direita	0,87±1,24/7	0,18±0,40/2 ^b	0 ^y
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,25±0,46/2	0,09±0,30/1	0
Micro-invasivo			
Face			
Dorso	1,25±1,48/10	0,72±1,00/8	0,25±0,86/3 ^b
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0	0,18±0,60/2	0,16±0,57/2
Média	1,00±1,41/8	0,45±0,93/5	0,08±0,28/1 ^b
Posterior	0,25±0,46/2	0,09±0,30/1	0
Posição			
Direita	0,37±0,74/3	0,72±1,00/8	0,16±0,57/2
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,87±1,45/7	0 ^b	0,08±0,28/1 ^a
Invasivo			
Face			
Dorso	0,87±1,64/7	1,27±1,55/14	0,33±0,77/4 ^b
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0,25±0,70/2	0,27±0,64/3	0,16±0,57/2
Média	0,12±0,35/1	0,09±0,30/1	0
Posterior	0,50±0,92/4	0,90±1,13/10	0,16±0,57/2 ^a
Posição			
Direita	0,50±1,41/5	0,45±0,82/5	0,16±0,57/2
Mediana	0	0,18±0,40/2	0
Esquerda	0,37±1,06/3	0,63±0,92/7	0,16±0,57/2

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^ap<0,05; ^bp<0,01; e ^yp<0,0001).

Tabela 5 – Distribuição do infiltrado inflamatório do carcinoma lingual após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Continuação**).

INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Profundamente Invasivo			
Face			
Dorso	1,00±1,51/8	0,81±0,98/9	0,83±1,33/10
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0	0	0,16±0,57/2
Média	0,25±0,70/2	0,27±0,64/3	0,50±1,24/6
Posterior	0,75±1,03/6	0,54±0,93/6	0,16±0,57/2
Posição			
Direita	0,50±1,41/4	0,18±0,60/2	0,66±0,98/8
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,50±0,92/4	0,63±0,92/7	0,16±0,57/2
Intensidade			
Carcinoma de Língua			
Discreta	1,00±0,92/8	1,27±1,42/14	0,08±0,28/1
Moderada	3,25±3,01/26	1,81±1,88/20	1,33±1,96/16 ^a
Acentuada	0	0	0
Intensidade/Tipos			
In Situ			
Discreta	0,37±0,51/3	0,27±0,64/3	0
Moderada	0,75±1,03/6	0 ^v	0 ^v
Acentuada	0	0	0
Micro-invasivo			
Discreta	0,50±0,92/4	0,36±0,50/4	0,08±0,28/1
Moderada	0,75±1,48/6	0,36±0,80/4	0,16±0,57/2
Acentuada	0	0	0
Invasivo			
Discreta	0,12±0,35/1	0,54±1,21/6	0
Moderada	0,75±1,48/6	0,72±1,34/8	0,33±0,77/4
Acentuada	0	0	0
Profundamente Invasivo			
Discreta	0	0,09±0,30/1	0
Moderada	1,00±1,51/8	0,72±1,00/8	0,83±1,33/10
Acentuada	0	0	0
Tipos de Intensidade			
Carcinoma de Língua			
Agudo	0	0	0
Subagudo	1,12±2,23/9	0,27±0,90/3	0,75±1,86/9
Crônico	4,50±2,56/36	4,18±3,51/46	1,00±1,59/12 ^y
Tipos de Intensidade/Tipos			
In Situ			
Agudo	0	0	0
Subagudo	0,37±1,06/3	0	0
Crônico	1,25±1,83/10	0,54±1,29/6	0 ^B
Micro-invasivo			
Agudo	0	0	0
Subagudo	0,37±1,06/3	0	0
Crônico	1,50±2,07/12	1,09±1,37/12	0,33±1,15/4 ^a
Invasivo			
Agudo	0	0	0
Subagudo	0	0,27±0,90/3	0
Crônico	1,00±1,85/8	1,09±2,07/12	0,33±0,77/4
Profundamente Invasivo			
Agudo	0	0	0
Subagudo	0,37±1,06/3	0	0,25±0,86/3
Crônico	0,75±1,03/6	0,90±1,04/10	0,66±1,30/8

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^B=p<0,01; e ^y=p<0,0001).

Tabela 5 – Distribuição do infiltrado inflamatório do carcinoma lingual após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental (**Conclusão**).

INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Grupos (M±DP/T)		
	G2 (n=8)	G5 (n=11)	G6 (n=12)
Localização/Tipos de			
Intensidade			
Subaguda			
Face			
Dorso	1,12±2,23/9	0,27±0,90/3	0,75±1,83/9
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	0	0	0
Média	1,12±2,23/9	0 ^a	0,75±1,86/9
Posterior	0	0,27±0,90/3	0
Posição			
Direita	0,75±1,38/6	0,27±0,90/3	0,50±1,16/6
Mediana	0	0	0
Esquerda	0,37±1,06/3	0	0,25±0,86/3
Crônica			
Face			
Dorso	4,50±2,56/36	4,18±3,51/46	1,00±1,59/12 ^y
Borda lateral	0	0	0
Ventre	0	0	0
Região			
Anterior	1,25±1,48/10	0,90±1,37/10	0,33±0,77/4
Média	1,25±1,48/10	1,45±2,01/16	0,33±0,77/4
Posterior	2,00±1,06/16	1,81±2,44/20	0,33±0,77/4 ^a
Posição			
Direita	2,25±1,98/18	2,00±1,54/22	0,66±0,98/8
Mediana	0	0,36±0,80/4	0
Esquerda	2,25±1,98/18	1,81±2,44/20	0,33±0,77/4 ^a

G2 (ratos oncológicos de língua/4-NQO), G5 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G6 (ratos oncológicos de língua/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). Obtiveram resultado zero os G1 (ratos saudáveis), G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol) não incluídos na tabela. Os resultados estão expressos em média, desvio-padrão e total (M±DP/T) da variável, analisados por ANOVA (*One/Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (^a=p<0,05; ^b=p<0,01; e ^y=p<0,0001).

Fonte: Autoria própria.

5.4.1 Fígado e rim

As análises histopatológicas dos fígados e rins nos diferentes grupos experimentais demonstraram diferenças importantes. As análises das alterações citotóxicas hepáticas demonstraram redução dos espaços sinusóides nos grupos G6 e G2, comparados com o grupo G5 ($P < 0,0001$) (Figura 15 e 16).

Já as análises histopatológicas dos rins demonstraram alterações citotóxicas. O grupo G4 (menor dose TP-4-ol) apresentou diferença estatisticamente significativa para a presença de necrose glomerular ($P < 0,05$) quando comparado com os grupos G1 (ratos saudáveis) e G3 (maior dose TP-4-ol), em acúmulo de pigmento amarelado intraglomerular comparado com o G1 ($P < 0,01$), em redução do espaço urinário no G4 comparado com G1 e G3 ($P < 0,05$), em ductos edemaciados no G4 comparado com o G2, G3, G5 e G6 ($P < 0,01$), em acúmulo de pigmento amarelado intracelular ductal com G1 ($P < 0,05$), em ductos proximais necróticos comparados com os G1 ($P < 0,01$) e G3 ($P < 0,05$) e em ductos distais necróticos comparados com o G1 ($P < 0,05$) e G3 (Figura 15 e 17).

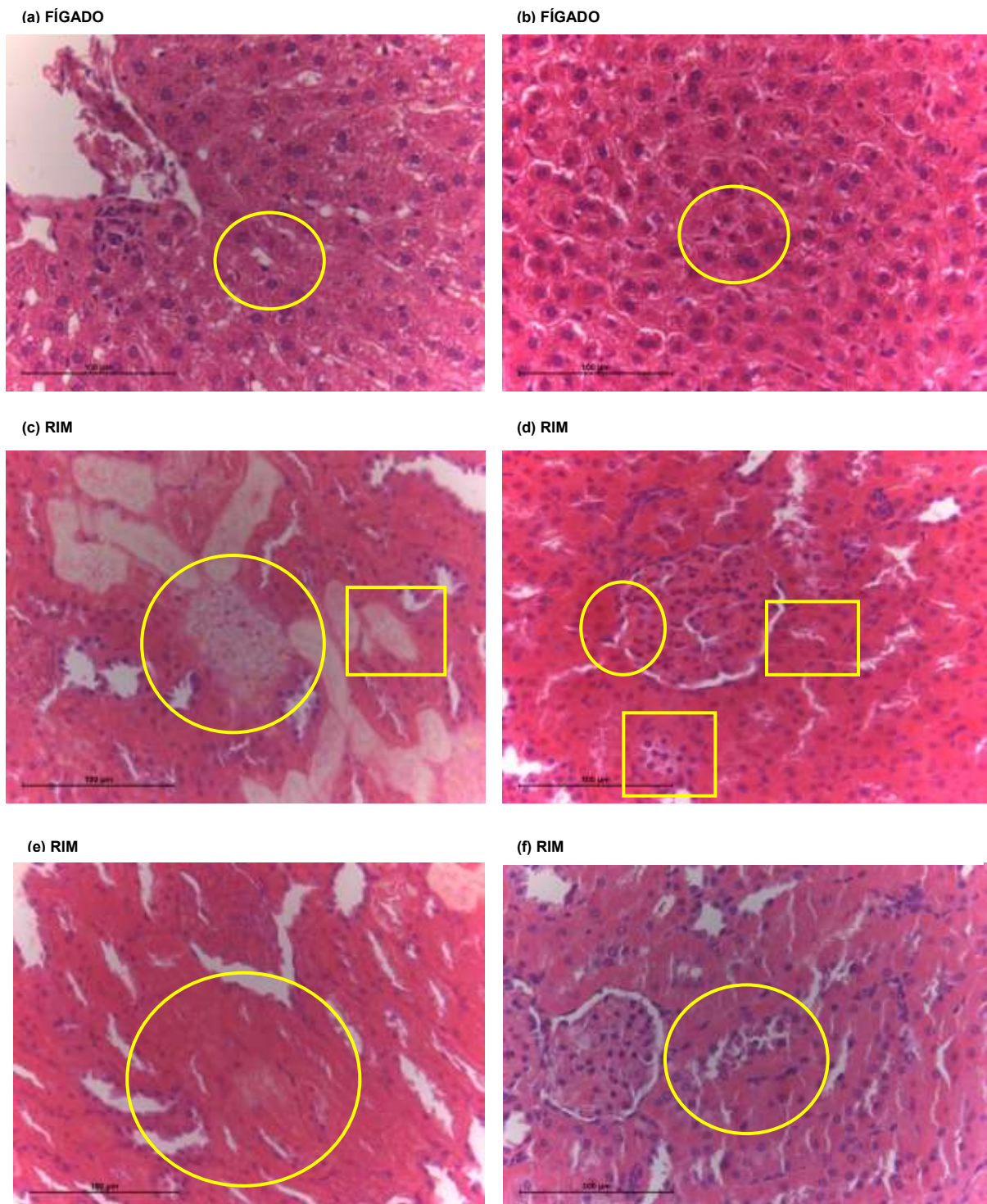
O G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) demonstrou maior acúmulo de pigmento amarelado intraglomerular e maior presença de ductos distais edemaciados comparados com o G2 ($P < 0,05$) (Figura 15 e 17).

O G3 (maior dose TP-4-ol), demonstrou maior frequência de ductos proximais edemaciados comparado com os G1 ($P < 0,05$) e G4 ($P < 0,01$) (Figura 15 e 17).

Já o G6 (4-NQO + menor dose TP-4-ol) demonstrou maior frequência de ductos proximais edemaciados que o G5 (4-NQO + maior dose TP-4-ol) ($P < 0,05$) (Figura 15 e 17).

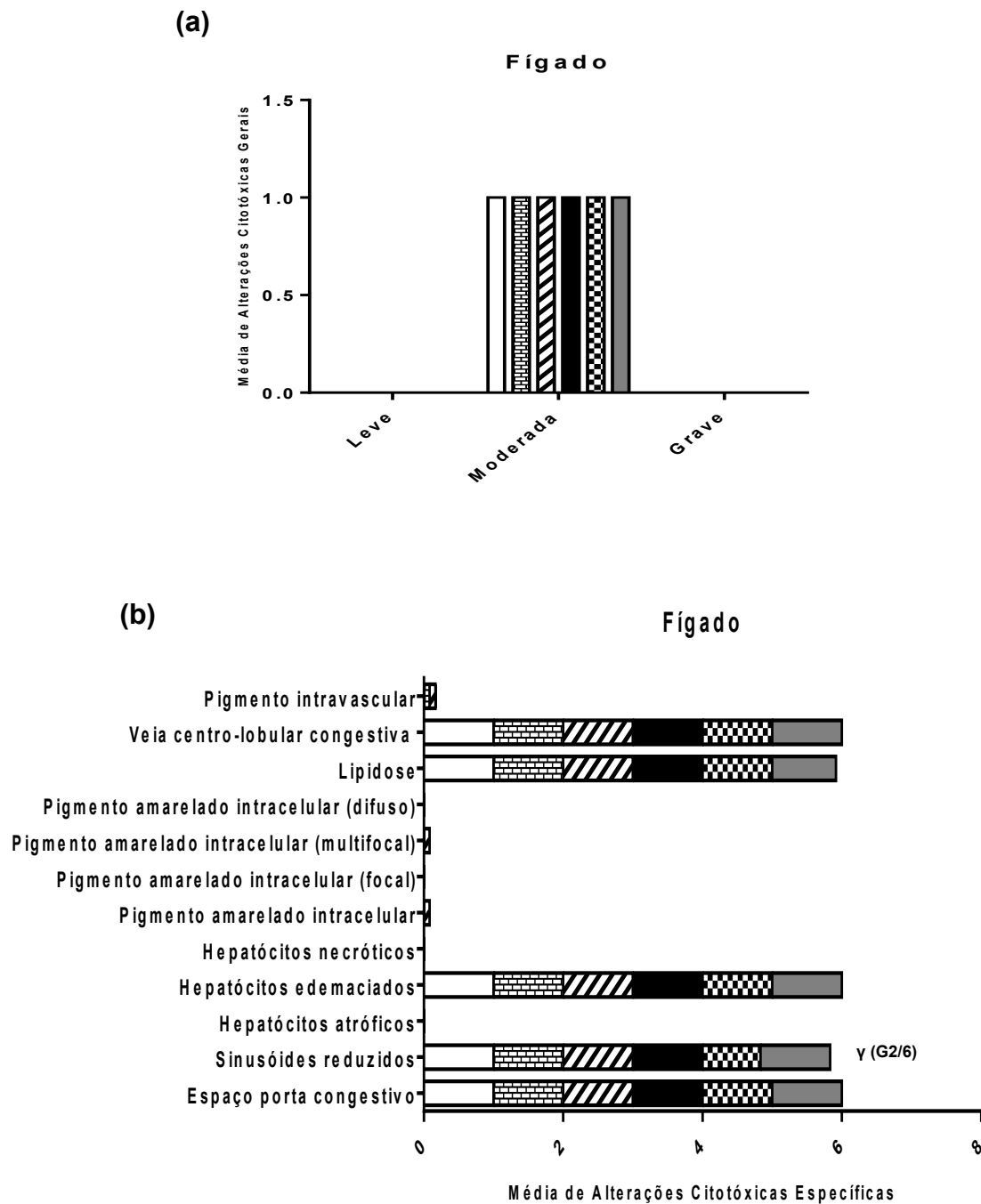
Na classificação geral das alterações citotóxicas dos rins, verificamos diferença estatisticamente significativa na classificação de citotoxicidade moderada comparando o G4 com o G1 ($P < 0,05$) (Figura 15 e 17).

Figura 15 – Distribuição das fotomicrografias das alterações citotóxicas do fígado e rim (H&E/400x) após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental. **(a)** sinusóides presentes (círculo) no G4 (ratos saudáveis tratados com 0,0035g/Kg de TP-4-ol); **(b)** sinusóides reduzidos (círculo) no G2 (ratos hepatopatas/4NQO); **(c)** glomérulo necrótico (círculo) e pigmento amarelado (quadrado) no G2 (ratos nefropatas/4NQO); **(d)** espaço urinário reduzido (círculo), ductos proximais e distais edemaciados (quadrado) no G2 (ratos nefropatas/4NQO); **(e)** ductos proximais necróticos (círculo) no G2 (ratos nefropatas/4NQO); e **(f)** ductos distais necróticos (círculo) no G2 (ratos nefropatas/4NQO).



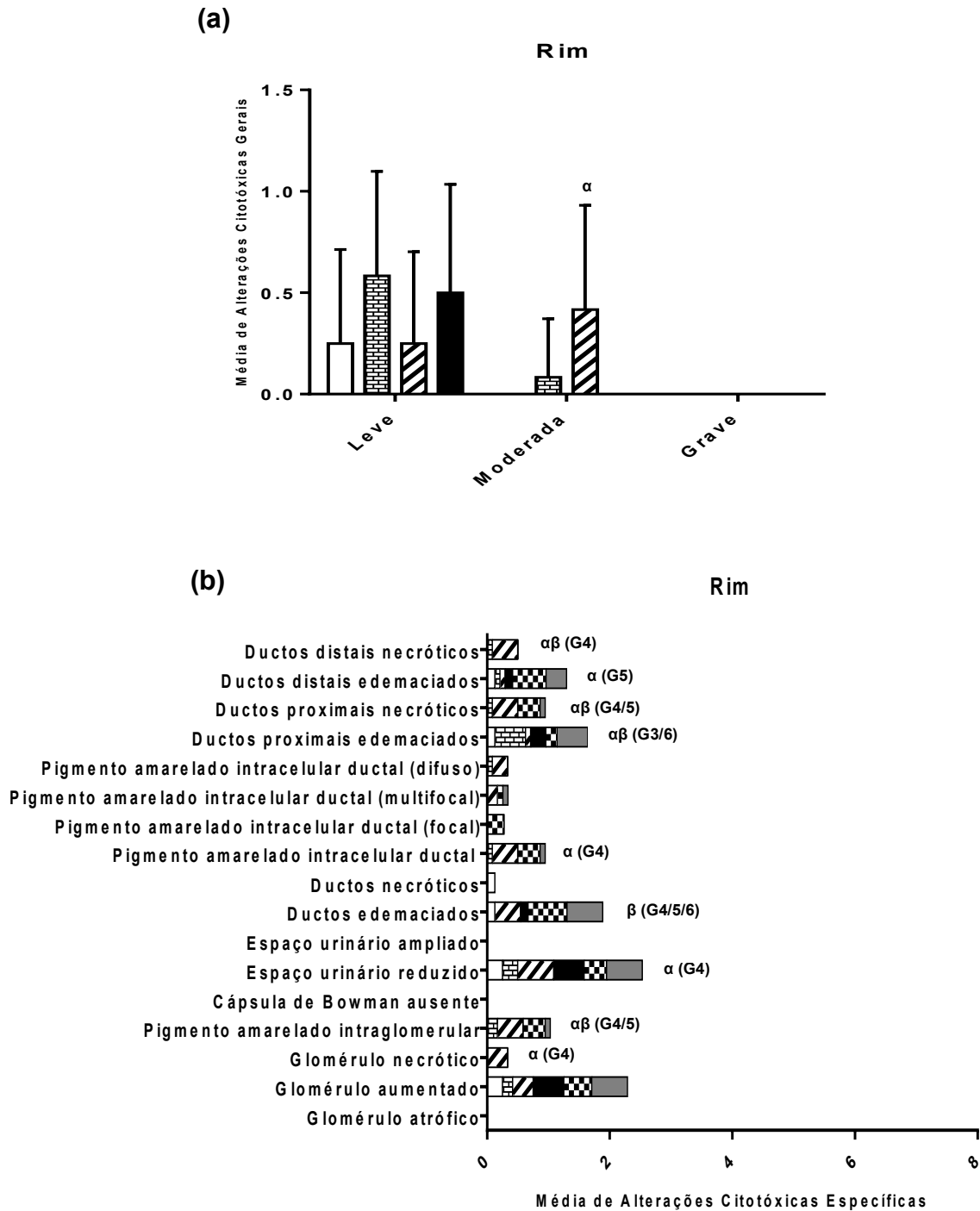
Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Distribuição das alterações citotóxicas do fígado após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental dos  G1 (ratos saudáveis),  G2 (ratos hepatopatas/4-NQO),  G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol),  G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol),  G5 (ratos hepatopatas/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e  G6 (ratos hepatopatas/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Alterações citotóxicas gerais e **(b)** específicas do fígado. Os resultados estão expressos em média (barras) e desvio-padrão (linhas verticais), analisados por ANOVA (Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas ($\alpha=p<0,05$; $\beta=p<0,01$; e $\gamma=p<0,0001$).



Fonte: Autoria própria.

Figura 17 – Distribuição das alterações citotóxicas do rim após a decapitação com 16 semanas dos ratos *Holtzman* machos, segundo o protocolo de indução da carcinogênese lingual e citotoxicidade hepática e renal, seguidos de tratamento experimental dos  G1 (ratos saudáveis),  G2 (ratos nefropatas/4-NQO),  G3 (ratos saudáveis + 0,035g/Kg/TP-4-ol),  G4 (ratos saudáveis + 0,0035g/Kg/TP-4-ol),  G5 (ratos nefropatas/4-NQO + 0,035g/Kg/TP-4-ol) e  G6 (ratos nefropatas/4-NQO + 0,0035g/Kg/TP-4-ol). **(a)** Alterações citotóxicas gerais e **(b)** específicas do rim. Os resultados estão expressos em média (barras) e desvio-padrão (linhas verticais), analisados por ANOVA (Two-Way) com pós-teste de Tukey's por comparação múltipla com as seguintes significâncias estatísticas (α =p<0,05; β =p<0,01; e γ =p<0,0001).



Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram a plena capacidade de indução carcinogênica em ratos *Holtzman* tratados com 4-NQO em propileno glicol diluído na água de beber na concentração 25ppm, uma vez ao dia por oito semanas.

O óbito de animais durante pesquisas utilizando 4-NQO é frequentemente descrito e estudos que utilizam maiores concentrações da substância apresentam maiores proporções de efeitos colaterais e óbitos (Avgoustidis et al.⁶, 2012; Gama et al.³⁰, 2014). De fato, que trabalharam com concentrações semelhantes as nossas, não relataram óbitos (Jesus et al.⁴⁶, 2014; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011). Isto sugere que a indução de carcinogênese por 4-NQO deva permanecer abaixo dos 30 ppm, e que o protocolo de exposição por 8 semanas é suficiente para induzir LPMM e malignas, permitindo identificar o possível efeito quimiopreventivo de uma substância teste, desde que seja adotado o critério de secção seriada da língua. Porém, convem salientar que alguns estudos que trabalharam com concentrações semelhantes as nossas demonstraram maior número de óbitos, tanto no grupo 4-NQO quanto nos grupos submetidos a tratamento quimiopreventivo (Grawish et al.³⁷, 2011; Helli et al.⁴¹, 2016; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013).

Os resultados biométricos do nosso estudo apresentaram aumento no consumo de água pelos dois grupos de ratos tratados com 0,0035g/Kg de TP-4-ol. Também observamos que o grupo 4-NQO apresentou baixo consumo de água. Os estudos de Long et al.⁵⁹ (2007), experimento por 22 semanas em ratos inicialmente induzidos com 4-NQO por 8 semanas, Yoshida et al.¹²¹ (2005) experimento por 32 semanas, inicialmente induzidos com 4-NQO por 8 semanas, Suzuki et al.¹⁰⁵ (2003) experimento por 32 semanas em ratos inicialmente induzidos com 4-NQO por 4 semanas e Tanaka et al.¹⁰⁸ (2002) experimento por 38 semanas em ratos inicialmente induzidos com 4-NQO por 8 semanas anteriores não relataram alteração estatisticamente significativa no consumo de água.

Apenas os ratos submetidos à carcinogênese por 4-NQO e tratados com 0,0035g/Kg de TP-4-ol demonstraram ganho de peso corporal e de língua. Além disso, baixos pesos do corpo e da língua foram verificados nos ratos 4-NQO. Os baixos pesos do fígado e rim foram averiguados nos ratos saudáveis tratados com a maior e menor dose de TP-4-ol. Os estudos de Helli et al.⁴¹ (2016) e Mehdipour et al.⁶⁵ (2013) apresentaram resultados semelhantes aos nossos, com diminuição do

peso corporal dos ratos 4-NQO (30 ppm) e aumento do peso corporal nos ratos tratados com quimiopreventivos naturais. Entretanto, Gonçalves et al.³⁶ (2015) não identificaram diferença de peso corporal dos ratos 4-NQO (50 ppm) e nos animais submetidos a tratamento quimiopreventivo natural.

Nenhum estudo descreveu o peso da língua dos animais, portanto, consideramos nossos dados inéditos e passíveis de serem replicados para futuras comparações, uma vez que o desenvolvimento de massas tumorais ou alterações renais podem influenciar no peso da mesma.

Para o fígado, os resultados apresentam-se variados e distoantes, por vezes são observadas reduções no peso hepático dos animais saudáveis expostos a um quimiopreventivo natural, por vezes aumento (Suzuki et al.¹⁰⁵, 2003; Tanaka et al.¹⁰⁸, 2002). Do mesmo modo, são descritos aumento ou redução do volume hepático nos animais 4-NQO (Long et al.⁵⁹, 2007; Suzuki et al.¹⁰⁵, 2003; Yoshida et al.¹²¹, 2005). Na verdade, até mesmo a ausência de diferença de peso hepático foi relatada na literatura (Yanaida et al.¹¹⁹, 2002). Estes resultados demonstram que a análise do peso hepático apresenta-se complexa e de difícil correlação com outros achados experimentais.

Yoshida et al.¹²¹, 2005 demonstrou aumento do peso renal nos animais induzidos por 4-NQO, concordando com nossos resultados, mas seus animais saudáveis tratados com quimiopreventivo natural demonstraram resultados opostos aos nossos.

A redução no consumo alimentar e/ou a perda gradual do peso corporal no modelo de quimioprevenção induzida por 4-NQO é um indicador relevante do avanço progressivo das LPMM para lesões malignas invasivas na língua dos animais, podendo ser relacionada à ineficácia do tratamento quimiopreventivo em estudo (McCormick et al.⁶⁴, 2010). De fato, nossos resultados demonstram que o grupo 4-NQO apresentou redução do consumo de água, mas não alterou o peso corporal, o peso da língua, do fígado, do rim ou o consumo de ração. Por outro lado, os animais tratados com as duas concentrações de TP-4-ol (0,035 e 0,0035g/Kg) no experimento de quimioprevenção e os animais exclusivamente tratados com 0,0035 g/Kg de TP-4-ol demonstraram aumento do peso corporal associada a redução do consumo de água. Além disso, os animais tratados com 0,0035g/Kg no experimento de quimioprevenção demonstraram aumento, estatisticamente significativo, do peso da língua. Estes achados, associados aos achados bioquímicos e histopatológicos

de nosso estudo, podem indicar um efeito citotóxico renal levando ao acúmulo de água nos animais estudados, mesmo sob redução do consumo da mesma. Entretanto, a redução do peso médio hepático nos grupos exclusivamente submetidos às duas doses de TP-4-ol confrontam essa teoria, tornando necessário o aprofundamento do estudo para propiciar conclusões específicas.

Nosso estudo demonstrou que 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. Resultados de estudos anteriores também demonstraram esse efeito hepatopata e nefrotóxico do 4-NQO (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

A concentração de 0,035g/Kg de TP-4-ol nos animais saudáveis produziu aumento nos resultados bioquímicos de ALT, ALP, uréia e creatinina. Esses aumentos chegaram a ser superiores aos observados no grupo 4-NQO para ALP e uréia. Além disso, esses animais saudáveis tratados com 0,035g/Kg de TP-4-ol também demonstraram alterações histopatológicas leves no 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, reduzindo suas concentrações plasmáticas. Viswanadha et al.¹¹⁴ (2011) apresentaram resultados semelhantes ao estudarem quimiopreventivo natural, relatando aumento da concentração de creatinina. Entretanto, os mesmos observaram redução dos níveis de ALP e uréia e aumento nas concentrações plasmáticas de ALT e AST. Por outro lado, assim como ocorreu em nosso estudo, Mohan et al.⁶⁷ (2016) evidenciaram redução das concentrações de ALT, ALP e creatinina no plasma sanguíneo de ratos previamente expostos ao 4-NQO e tratados com quimiopreventivo natural. Porém, nossas análises histopatológicas renais demonstraram presença de citotoxicidade leve a moderada nos animais saudáveis expostos a 0,0035g/Kg. Nesse grupo observamos ductos distais necróticos, ductos proximais necróticos, glomérulos necróticos, acúmulo de pigmento intracelular amarelado e acúmulo de pigmento amarelado intraglobular.

O aumento das concentrações plasmáticas de ALT, AST e ALP e o aumento das concentrações de ureia e creatinina, são considerados como bons indicadores de citotoxicidade hepática e renal (Mohan et al.⁶⁷, 2016; Viswanadha et al.¹¹⁴, 2011).

Nesse sentido, nosso estudo recomenda o uso da menor dose de TP-4-ol como agente quimiopreventivo e demonstra que, quando aplicado nos animais previamente submetidos ao processo de carcinogênese por 4-NQO, parte dos efeitos tóxicos propiciados pelo 4-NQO são reduzidos.

Em relação às análises macroscópicas, observamos que o tratamento com 0,0035g/Kg de TP-4-ol em ratos previamente submetidos ao carcinógeno 4-NQO demonstrou menor número de lesões fundamentais na análise macroscópica tanto em dorso quanto na região posterior e mediana da língua. E para a concentração de 0,035g/Kg, observamos redução do número de lesões fundamentais na região mediana. Adicionalmente, verificamos redução do número de lesões brancas em ambas as concentrações do quimiopreventivo. Além disso, verificamos que o volume das lesões reduziu-se em ambos os tratamentos com TP-4-ol. Alguns autores, relataram lesões tumorais exofíticas, localizadas no dorso e região posterior da língua (Grawish et al.³⁷, 2011; Tanaka et al.¹⁰⁸, 2002; Yanaida et al.¹¹⁹, 2002; Yoshida et al.¹²¹, 2005), por vezes de grande tamanho (Grawish et al.³⁷, 2011). Do mesmo modo, relataram redução significativa da quantidade (Grawish et al.³⁷, 2011; Tanaka et al.¹⁰⁸, 2002; Yanaida et al.¹¹⁹, 2002; Yoshida et al.¹²¹, 2005) e tamanho das lesões linguais nos animais tratados com quimiopreventivo natural (Grawish et al.³⁷, 2011).

Todavia, os estudos publicados na literatura, raramente, descrevem as lesões clínicas por meio da descrição de lesões fundamentais. Fong et al.²⁷ (2006) tendo camundongos como animais de estudo, apontaram a redução macroscópica de 100% das lesões brancas na língua dos animais. Entretanto, mesmo esse estudo, aborda as lesões brancas como lesões “leucoplásicas”.

Embora o estudo geral das lesões macroscópicas seja frequentemente relatado, a identificação criteriosa das regiões de acometimento das lesões permite que os estudos subsequentes considerem diferentes regiões para o surgimento das lesões clínicas e histológicas do estudo de quimioprevenção induzida por 4-NQO. Em nosso estudo, as lesões se concentraram na região de dorso e posterior da língua dos animais e, em ambas as regiões pudemos evidenciar diferenças estatisticamente significantes entre os grupo 4-NQO e o TP-4-ol. Porém, conforme nosso estudo as diferentes regiões demonstram a presença de lesões clínicas. Portanto, recomendamos a criteriosa análise macroscópica da língua de animais em experimento de quimioprevenção induzida por 4-NQO, pois esses resultados podem

evidenciar ou não o efeito carcinogênico do 4-NQO em induzir LPMM de língua e aceitar ou rejeitar a hipótese de quimioprevenção de um agente natural (Grawish et al.³⁷, 2011).

Considerando que a leucoplasia é um termo clínico aplicado a lesões em humanos que consideram aspectos etiológicos para permitir essa hipótese diagnóstica e levando-se em consideração que os animais submetidos ao experimento de quimioprevenção induzida por 4-NQO demonstram grande frequência de lesões tipo placa branca ou mancha branca. Recomendamos a adoção do termo placa e mancha branca, pois o experimento não permite obter ações clínicas semelhantes às realizadas na clínica odontológica para aplicação do termo “Leucoplasia”.

Isto posto, baseado em nossos resultados macroscópicos, aconselhamos a utilização de 0,035g/Kg de TP-4-ol como quimiopreventivo (quimioprotetor) de lesões fundamentais do tipo placas brancas.

As análises histopatológicas realizadas em nosso estudo demonstraram redução do número médio de lesões histopatológicas utilizando a concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol como quimiopreventivo de ratos submetidos a carcinogênese por 4-NQO. Nossos resultados demonstraram redução no dorso, região anterior e posições direita e esquerda. Também identificamos que, embora as lesões nas regiões anterior e média da língua sejam semelhantes, o mesmo não ocorre na região posterior da língua, onde verificamos uma tendência de maior acometimento de lesões histopatológicas na posição esquerda da língua dos animais. De fato, verificamos uma relação direita/esquerda na ordem de 45/55%. Desse modo, recomendamos cautela em experimentos que seccionam a língua ao centro para análises moleculares, uma vez que a distribuição não é equalitária.

Especificamente em relação aos tipos de lesão histológica, nosso estudo demonstrou que a concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol produziu redução do número total de displasias no dorso, regiões anterior, média e posterior e posições direita e esquerda. Também demonstrou redução específica do número de displasias leves localizadas no dorso e de displasias moderadas localizadas no dorso e na posição esquerda.

Já a concentração de 0,035g/Kg de TP-4-ol reduziu o número de alterações histopatológicas localizadas no dorso, região anterior e posição esquerda. Além disso, reduziu as hiperplasias no dorso em posição esquerda e moderada no dorso.

Estudos anteriores também observaram melhores resultados em doses menores de tratamento com quimiopreventivo natural (Helli et al.⁴¹, 2016; Jesus et al.⁴⁶, 2014; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Ribeiro et al.⁸⁸, 2014; Ribeiro et al.⁸⁹, 2015; Yoshida et al.¹²¹, 2005). Mas outros observaram melhores resultados na maior dose do estudo (Helli et al.⁴¹, 2016; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Yoshida et al.¹²¹, 2005).

Do mesmo modo, anteriormente também foi verificado efeito sobre as lesões hiperplásicas (Helli et al.⁴¹, 2016; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Yoshida et al.¹²¹, 2005), displásicas totais (Grawish et al.³⁷, 2011; Helli et al.⁴¹, 2016; Jesus et al.⁴⁶, 2014; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Ribeiro et al.⁸⁸, 2014; Ribeiro et al.⁸⁹, 2015; Yoshida et al.¹²¹, 2005), sobre displasias leves (Long et al.⁵⁹, 2007; Yoshida et al.¹²¹, 2005) e displasias moderadas (Grawish et al.³⁷, 2011; Helli et al.⁴¹, 2016; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Yoshida et al.¹²¹, 2005).

Como a eficácia do agente quimiopreventivo é verificada pela regressão das alterações histopatológicas no grupo tratado, comparado ao controle com o 4-NQO (Helli et al.⁴¹, 2016; Jesus et al.⁴⁶, 2014; Long et al.⁵⁹, 2007; Mehdipour et al.⁶⁵, 2013; Ribeiro et al.⁸⁸, 2014; Ribeiro et al.⁸⁹, 2015; Yoshida et al.¹²¹, 2005), sugerimos a utilização da maior e menor dose de TP-4-ol como agente quimiopreventivo das alterações histopatológicas de língua (quimiotetizador) de ratos submetidos a carcinogênese por 4-NQO.

Em nosso estudo, realizamos a classificação de risco de malignização nas displasias moderadas nos animais submetidos ao carcinógeno 4-NQO. Diferentemente do que ocorre em humanos que demonstrou 87,5% de displasias moderadas classificadas como de alto risco (Kujan et al.⁵⁴ (2006), nossos ratos, demonstraram predomínio da classificação de baixo risco de malignização. Esses resultados reenfazem a característica predominante do desenvolvimento das LPMM e carcinomas no modelo de quimioprevenção induzida pelo 4-NQO, onde são relatados predomínios de lesões bem diferenciadas (Ribeiro et al.⁸⁹, 2015).

A concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol reduziu o número de alterações arquitetônicas (perda de polaridade das células basais, cristas epiteliais em forma de gota e número de figuras de mitoses) e citológicas (anisonucleose e pleomorfismo nuclear). Já a dose de 0,035g/Kg de TP-4-ol reduziu número de alterações citológicas (anisonucleose). Munido desses resultados e considerando a ausência

de análises semelhantes em experimentos anteriores de quimioprevenção induzida por 4-NQO, recomendamos a adoção da metodologia de risco de malignização para identificar diferenças arquitetônicas e citológicas em processos displásicos de animais submetidos ao carcinógeno 4-NQO.

Com base nos resultados, recomendamos também o uso de ambas as concentrações de TP-4-ol como agente quimiopreventivo de lesões displásicas, dando ênfase para a maior capacidade da concentração de 0,0035g/Kg de inibir o surgimento desses tipos de lesões histológicas.

Além disso, a dose de 0,0035g/Kg de TP-4-ol demonstrou capacidade de reduzir o número de carcinoma de língua no dorso, região anterior e posição esquerda. Também relatamos que o carcinoma in situ, micro-invasivo e invasivo foram reduzidos nos animais expostos a essa concentração de TP-4-ol. Dentre eles, verificamos que ocorreu redução de mais de 80% de carcinomas in situ no dorso, região anterior e posição direita, mais de 70% de carcinomas micro-invasivo no dorso em região média e posições direita e esquerda e mais de 80% de carcinomas invasivos no dorso em região posterior. Alguns estudos anteriores também observaram redução do número de carcinomas no dorso em região posterior utilizando substâncias naturais tais como Abbasi et al.¹ (2014), Fong et al.²⁸ (2011), Grawish et al.³⁷ (2011), Lubet et al.⁶¹ (2011) e McCormick et al.⁶⁴ (2010).

De fato, o carcinoma in situ foi reduzido em 50% no dorso (Abbasi et al.¹, 2014). Do mesmo modo, o carcinoma micro-invasivo foi reduzido entre 60% e 90% no dorso e região posterior (Fong et al.²⁸, 2011; Lubet et al.⁶¹, 2011; McCormick et al.⁶⁴, 2010). Já o carcinoma invasivo já demonstrou reduções de 40 a 90% no dorso e região posterior da língua (Abbasi et al.¹, 2014; Fong et al.²⁸, 2011; Lubet et al.⁶¹, 2011; McCormick et al.⁶⁴, 2010).

As análises do grau de invasão microscópico dos carcinomas de língua denotam a eficácia do modelo de 4-NQO em impedir o desenvolvimento das lesões malignas e até mesmo LPMM (McCormick et al.⁶⁴, 2010; Peng et al.⁷⁹, 2015; William; Papadimitrakopoulou¹¹⁷, 2013). Sendo assim, baseados em nossos resultados, recomendamos a administração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol como quimiopreventivo para o desenvolvimento de carcinomas de língua na fase de progressão do modelo de quimioprevenção induzida por 4-NQO.

Ao analisarmos o infiltrado inflamatório associado aos carcinomas diagnosticados em nosso estudo, verificamos que a concentração de 0,0035g/Kg de

TP-4-ol propiciou redução de intensidade e do infiltrado inflamatório crônico nos carcinomas analisados. Já a dose de 0,035g/Kg de TP-4-ol propiciou redução de intensidade e do infiltrado inflamatório subagudo nos carcinomas analisados. Apenas um estudo foi identificado relatando o tipo de infiltrado inflamatório presente nos carcinomas dos ratos induzidos por 4-NQO, os autores relataram a presença de infiltrado inflamatório crônico (Tanaka et al.¹⁰⁹, 2014). Devemos considerar que nossos achados foram influenciados pela drástica redução no desenvolvimento de carcinomas nos grupos tratados com TP-4-ol. Por outro lado, a presença de infiltrado inflamatório em lesões malignas pode auxiliar ou dificultar o crescimento tumoral (Tanaka et al.¹⁰⁹, 2014), sendo assim, recomendamos aprofundamento do estudo do papel das células inflamatórias em modelo de quimioprevenção induzida por 4-NQO, uma vez que já foram relatados efeitos anti-inflamatórios do TP-4-ol (Bakkali et al.⁹, 2008).

O potencial citotóxico da concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol foi verificado em nosso estudo. Observamos alterações histopatológicas que foram classificadas como de grau moderado para os rins desse grupo de estudo. Nesses animais, verificamos aumentos de necrose glomerular, acúmulo do pigmento amarelado intraglomerular, redução do espaço urinário, ductos proximais edemaciados, acúmulo de pigmento amarelado intracelular ductal, ductos proximais necróticos, ductos distais edemaciados e necróticos. A mesma dose também reduziu os sinusóides hepáticos. Por outro lado, verificamos redução dos achados citotóxicos nos animais previamente submetidos ao carcinógeno 4-NQO na mesma concentração de TP-4-ol.

Do mesmo modo, a dose de 0,035 g/Kg de TP-4-ol, também demonstrou toxicidade renal, sendo classificada como de grau leve. Entretanto, quando administrada nos animais previamente submetidos ao carcinógeno 4-NQO, demonstrou redução das citotoxicidades renal e hepática.

Shuvy et al.⁹⁹ (2011) também observou a presença de ductos edemaciados e pigmento, descrito pelos autores como sendo de cor acastanhada, entretanto, os autores observaram essas alterações em dose semelhante a nossa maior dose.

Por outro lado, Viswanadha et al.¹¹⁴ (2011) verificaram que ratos expostos a 20ppm de 4-NQO por 8 semanas apresentaram alteração degenerativa em glomérulo renal, alteração semelhante a observada em nossos animais expostos a 25ppm de 4-NQO.

Em nosso experimento, o 4-NQO foi capaz de alterar os resultados bioquímicos de ALT, ALP, uréia e creatinina, também produziu alterações histopatológicas leves nos rins. Mas a concentração de 0,0035g/Kg de TP-4-ol demonstrou capacidade de reduzir os efeitos bioquímicos da prévia exposição ao 4-NQO em ALT, ALP, uréia e creatinina. Isto posto e considerando nossos resultados citotóxicos evidenciados na análise bioquímica e histopatológica dos animais saudáveis expostos a 0,0035g/Kg de TP-4-ol, podemos concluir que as alterações oxidativas produzidas pela exposição ao 4-NQO propiciaram redução do efeito citotóxico renal do TP-4-ol, possivelmente pelo tropismo de citotoxicidade observada sobre as células malignas e sobre as lesões LPMM. Este resultado demonstra especificidade da substância por esses tipos celulares (Chooluck et al.¹⁹, 2013).

O TP-4-ol pode ser aplicado como quimiopreventivo para lesões fundamentais, alterações histopatológicas e LPMM. Além de apresentar efeito reducional sobre carcinoma in situ, micro-invasivo e invasivo de língua de ratos.

Embora a substituição do 4-NQO por água por uma semana não tenha surtido efeito apenas em 1 animal dos 4 que apresentaram sinais de sofrimento em nosso estudo, recomendamos o acompanhamento de todos os animais e, caso sejam evidenciadas características como, pelos uríçados, perda de peso acentuada, letargia ou sofrimento do animal, sugerimos a substituição por água por uma semana.

Do mesmo modo, nossa classificação morfohistopatológica das localizações das lesões de língua permitiu a identificação de diferenças específicas em várias análises histopatológicas. Sendo assim, recomendamos a adoção desse padrão de análise.

A principal limitação de nosso estudo é o aprofundamento dos aspectos biomoleculares envolvidos na exposição ao TP-4-ol nos ratos previamente submetidos ao carcinógeno 4-NQO. Entretanto, também pudemos identificar que a secção da língua para permitir ambas as análises em um experimento pode produzir viés nos resultados histopatológicos e moleculares, uma vez que as lesões não se distribuem equalitariamente e tão pouco apresentam-se no mesmo grau de invasão ou de desenvolvimento dentro das LPMM.

Os resultados obtidos em nossas análises em relação aos parâmetros biométricos, bioquímicos, macroscópicos e microscópicos apontam para a eficácia quimiopreventiva (quimioprotetora) da dose de 0,0035g/Kg do TP-4-ol a cada 24

horas, por oito semanas consecutivas no estágio de progressão e em LPMM de língua de ratos *Holtzman* previamente expostos ao carcinógeno 4-NQO. Entretanto, a mesma dose de TP-4-ol aplicada em ratos saudáveis demonstrou potencial toxicológico renal.

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, Nisyrlos 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, Zavattero 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.

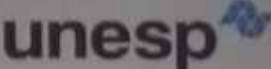
87. Reid JM, Walden CA, Qin R, Ziegler KL, Haslam JL, Rajewski RA, et al. Phase 0 clinical chemoprevention trial of the Akt inhibitor SR13668. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(3):347-53.
88. Ribeiro FA, de Moura CF, Gollucke AP, Ferreira MS, Catharino RR, Aguiar O Jr, et al. Chemopreventive activity 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, Beerl 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.

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado ***"ANÁLISE DO EFEITO DE TERPINEN-4-OL EM MODELO DE QUIMIOPREVENÇÃO DE RATOS TRATADOS COM ÓXIDO DE 4-NITROQUINOLINA"***, protocolo nº 8/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Cleverton Roberto de Andrade** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 18/11/2015.

Vigência do Projeto	Junho/2017
Espécie/linhagem	Rato – Holtzmann
Nº de animais	64
Peso/Idade	50-75g – 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua Humaitá nº 1.600 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
1º andar - Fone (16) 3301-6439 / Fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@fod.unesp.br - home page: <http://www.fod.unesp.br>