



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

JULIANA MARIA SORBO

**Avaliação da atividade antitumoral de nitensidina A, isolada
de *Pterogyne nitens*, em modelo animal de carcinogênese
induzida por 4NQO**

Araraquara

2016

JULIANA MARIA SORBO

**Avaliação da atividade antitumoral de nitensidina A, isolada
de *Pterogyne nitens*, em modelo animal de carcinogênese
induzida por 4NQO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane P. Soares

Coorientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2016

JULIANA MARIA SORBO

**Avaliação da atividade antitumoral de nitensidina A, isolada de
Pterogyne nitens, em modelo animal de carcinogênese induzida por
4NQO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Araraquara, 15 de dezembro de 2016.

Banca examinadora

Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Profa. Dra. Denise Crispim Tavares

Profa. Dra. Valéria Valente

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo o doutorando contemplado com bolsa CAPES.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Waldo e Irma, por todo amor, dedicação e incentivo que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora do Carmo pela vida, saúde e proteção.

Aos meus pais, por me educarem da melhor maneira, sendo pra mim um exemplo de vida a seguir. Aos meus irmãos Júnior e Ana, meus sobrinhos Bruna e Murilo, meus cunhados Patrícia e Jackson, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando. A todos da minha família que torceram por mim durante essa caminhada.

Ao meu namorado Felipe, que esteve presente em todas as fases, me ajudando a superar cada dificuldade encontrada, por toda paciência, companheirismo e amor.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Christiane Pienna Soares pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e carinho de sempre.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Luis Octavio Regasini e Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade pelo apoio, dedicação e orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Valéria Valente pelos ensinamentos e por sua amizade durante todos esses anos.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, pela amizade e parceria, em especial ao técnico Marcos, sempre dispostos a nos ajudar.

Agradeço as minhas amigas: Geovana Navegante, Bárbara Colato, Thais Moreira, Thais Falcoski e Mariana Beltrame que além de toda contribuição na realização dos experimentos, estiveram ao meu lado durante todos esses anos nos momentos bons e ruins, sempre com muito carinho e amizade. Vocês são muito especiais!

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, aos laboratórios vizinhos, Micologia Clínica, Bioquímica Clínica, Imunologia, Núcleo de Proteômica e todos os funcionários da FcFar por contribuírem de alguma maneira para realização deste projeto.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

RESUMO

O câncer é considerado um grave problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde estimou que no ano de 2030 podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente com esse tipo de doença. Diante disso, buscam-se, incessantemente, novos fármacos na tentativa de melhorar a sobrevida desses pacientes. Aproximadamente 70% das drogas disponíveis na quimioterapia atualmente são de origem natural, contribuindo intensamente para o desenvolvimento da terapia moderna. O alcalóide guanidínico, (nitensidina A) isolado de *Pterogyne nitens*, planta típica do cerrado brasileiro demonstrou citotoxicidade contra células de carcinoma epidermóide cervical (SiHa). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi verificar a atividade antitumoral, genotóxica e mutagênica da nitensidina A, por meio de experimentos *in vitro* (linhagem de CEC oral – HSC-3) e *in vivo*, empregando o modelo de indução por 4NQO – 4-nitroquinolona-1-óxido em ratos. O composto nitensidina A para as linhagens HSC-3 e HaCat, demonstrou atividade citotóxica, morte celular por apoptose e necrose, porém não houve indução na ativação da caspase-3, enzima que participa do processo da via intrínseca de apoptose, ainda demonstrou potencial mutagênico e diminuição no estresse oxidativo. Para a linhagem HSC-3 não houve expressão dos níveis de AKT fosforilada em ser-473. Os experimentos *in vivo* demonstraram que o modelo de indução por 4NQO foi efetivo, porém o tratamento realizado nos animais com nitensidina A demonstrou redução no processo de carcinogênese na menor dose testada (2mg/kg p.c.), houve invasão dos tumores, não houve diminuição do índice mitótico e não obtivemos áreas em necrose. Os parâmetros bioquímicos analisados (glicemia, uréia, creatinina, toxicidade hepática e níveis de malondialdeído) não tiveram nenhuma alteração, sugerindo que o alcalóide nitensidina A não apresentou ação tóxica sistêmica, porém demonstrou perfil genotóxico demonstrado no ensaio do cometa.

Palavras chave: Carcinoma epidermóide oral. Nitensidina A. 4NQO. Morte celular.

ABSTRACT

Cancer is considered a serious public health problem. The World Health Organization estimated by the year 2030 27 million new cases, 17 million deaths, 75 million people diagnosed with cancer. In this scenario, efforts have been made to improve patient survival. Approximately 70% of the chemotherapeutic agents are derived from natural sources, contributing greatly to the development of modern therapeutic drugs. Guanidine alkaloid (nitensidine A) isolated from *Pterogyne nitens*, a typical Brazilian cerrado plant, showed cytotoxicity against cervical epidermoid carcinoma cells. Taking this into consideration, the aim of this study was to evaluate nitensidine A antitumor, genotoxic and mutagenic activity *in vitro* (HSC-3 cell line) and *in vivo* (mice) induced by 4-nitroquinoline (4-NQO). The guanidine alkaloid demonstrated cytotoxicity activity, cell death induction by apoptosis and necrosis in HSC-3 and HaCat cell lines. However, there was no caspase3 activation. Besides that, it demonstrated mutagenic potential and decreased oxidative stress. HSC-3 cell line did not show any phosphorylated AKT levels at ser-473. *In vivo* experiments indicated that 4NQO induction model was effective, although the treatment did evidence reduction in the carcinogenic process only at the lowest dose tested (2mg / kg b.c.). Animals exposed to 4NQO presented tumor invasion, but there was no mitotic index decreased and no necrosis areas. Biochemical parameters (glycemia, urea, creatinine, hepatic toxicity and levels of malondialdehyde) analyzed did not show any change, suggesting that although nitensidine A has genotoxic and mutagenic activity, it has no systemic toxicity.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Nitensidine A. 4NQO. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta <i>Pterogyne nitens</i> em seu habitat.....	22
Figura 2: Fórmula estrutural da nitensidina A.....	23
Figura 3: Tipos de morte celular.....	24
Figura 4: Ativação da pocaspase durante a apoptose.....	25
Figura 5: Via extrínseca da apoptose.....	26
Figura 6: Via intrínseca da apoptose.....	27
Figura 7: Fluoxograma de análise do ensaio de anexina-V.....	37
Figura 8: Fluoxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.....	38
Figura 9: Divisão dos grupos na indução da carcinogênese.....	43
Figura 10: Ensaio de citotoxicidade (SRB).....	48
Figura 11: Ensaio de Anexina V na linhagem HSC-3.....	51
Figura 12: Ensaio de Anexina V na linhagem HaCat.....	53
Figura 13: Ensaio de citomorfológico de exclusão de fluorocromos - HSC-3.....	54
Figura 14: Ensaio citomorfológico de exclusão de fluorocromos – HaCat.....	56
Figura 15: Morfologia das células.....	59
Figura 16: Ensaio do TUNEL.....	60
Figura 17: Células TUNEL positivo e TUNEL negativo.....	61
Figura 18: Ensaio de Caspase-3.....	66
Figura 19: Frequência de Micronúcleos.....	67
Figura 20: Ensaio de TBARS nas linhagens HSC-3 e HaCaT.....	70
Figura 21: Expressão dos níveis de AKT, fosforilação de AKT em ser-473 e caspase-3 na linhagem HSC-3.....	71
Figura 22: Expressão dos níveis de AKT, fosforilação de AKT em ser-473 e caspase-3 na linhagem HaCat.....	72
Figura 23: Lesões induzidas pelo 4NQO nos animais.....	80
Figura 24: Peso dos animais.....	81
Figura 25: Aspectos Macroscópicos das Lesões.....	83
Figura 26: Tipos de Lesões.....	83
Figura 27: Relação entre Placa Branca, Mosqueado e Mancha Eritematosa.....	84
Figura 28: Relação entre Úlcera, Pápula e Petéquia.....	86
Figura 29: Relação entre Nódulo e Papiloma.....	87

Figura 30: Porcentagem de Displasia – Grau I.....	90
Figura 31: Análise histológica.....	90
Figura 32: Tipos de Carcinoma.....	92
Figura 33: Tipos de Invasão.....	93
Figura 34: Análise Histológica – Carcinoma epidermóide invasivo.....	95
Figura 35: Relação entre as lesões Acantose e hiperqueratose.....	96
Figura 36: Análise Histológica: Acantose e Hiperqueratose.....	96
Figura 37: Relação entre intensidade e tipo de inflamação.....	97
Figura 38: Intensidade e Tipo de Inflamação.....	98
Figura 39: Relação entre espongiase e reação liquenóide.....	100
Figura 40: Espongiase e Reação Liquenóide.....	101
Figura 41: Glicemia (mg/dL).....	105
Figura 42: Ureia e Creatinina.....	106
Figura 43: Atividade das enzimas AST/ALT/ALP.....	108
Figura 44: Concentração de MDA nos órgãos ($\mu\text{mol/g}$ de tecido).....	110
Figura 45: Concentração de MDA plasmático.....	111
Figura 46: Ensaio do Cometa.....	112
Figura 47: Células do cometa.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa do número de novos casos na Região Sudeste.....	21
Tabela 2: Anexina V nas linhagens HSC-3 e HaCat.....	57
Tabela 3: Ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos nas linhagens HSC-3 e HaCat.....	58
Tabela 4: Características das Lesões.....	82
Tabela 5: Avaliação do Índice Mitótico.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A.C. Camargo – A.C. Camargo Câncer Center

AKT – v-akt oncogene viral de timoma murino (ou proteína quinase B – PKB)

ALP – fosfatase alcalina

ALT – alanina aminotransferase

AMC – aminometilcumarina

APAF1 – protease apoptótica ativadora de fator-1

ANOVA – análise de variância

AST – aspartato aminotransferase

ATCC- American Type Culture Collection

ATP – adenosina trifosfato

ATV – associação de tripsina e versene

CEC – carcinoma espinocelular

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CURC – curcumina

CV- controle de veículo

CI₅₀ – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular

DAF – diacetato de fluoresceína

DISC – complexo de sinalização indutor de morte (death-inducing signaling complex)

DMBA - dimetilbenzatraceno

DMEM – Dulbecco`s modification of Eagle´s medium

DOX- doxorubicina

DTT - ditioneitol

EP - erro padrão

FITC - isotiocianato de fluoresceína

Gy/min- gray por minuto

HaCat – linhagem de queratinócito humano

H.E. – hematoxilina e eosina

HO – Hoechst

HO/IP – Hoechst e iodeto de propídeo -

HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HSC-3 – linhagem de carcinoma epidermóide de boca

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IP – Iodeto de Propídio

LDH – lactato desidrogenase

MDA – malondialdeído

MDH – malato desidrogenase

mg/kg p.c. – miligrama por kilograma e peso corpóreo

NuBBE- Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

q.s.p.- quantidade suficiente para

SCC – carcinoma de células escamosas

SFB – soro fetal bovino

SRB – sulforrodamina B

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TM – tail moment

“TUNEL” - terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dutp nick end labeling

4NQO – 4-nitroquinolona-1-óxido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Câncer Bucal.....	19
1.2. Produtos Naturais e o Câncer	21
1.2.1. Nitensidina A.....	23
1.3. Morte Celular.....	24
1.3.1. Apoptose.....	25
1.3.2. Necrose	28
1.3.3. Senescência.....	29
1.3.4. Autofagia	30
1.3.5. Catástrofe Mitótica	30
1.4. Carcinogênese Experimental	31
2. OBJETIVO	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Procedimentos Fitoquímicos: Obtenção de Nitensidina A.....	34
3.2. Cultura de Células	35
3.3. Tratamento das Linhagens celulares e dos Animais.....	36
3.4. Ensaio <i>in vitro</i>	37
3.4.1. Citotoxicidade com Sulforrodamina B (SBB).....	37
3.4.2. Ensaio de Morte Celular	37
3.4.2.1. Anexina V.....	35
3.4.2.2. Ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos (Hoechst e iodeto de propídeo - HO/IP).....	36
3.4.2.3. "TUNEL"	38
3.4.2.4. Avaliação da atividade da caspase-3.....	38
3.4.3. Avaliação do Potencial Mutagênico - Ensaio do Micronúcleo	41

3.4.4. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	42
3.4.5. Análises de <i>Western blot</i>	42
3.5. Ensaio <i>in vivo</i>	43
3.5.1. Animais.....	43
3.5.2. Indução da Carcinogênese	44
3.5.3. Análise Histopatológica.....	45
3.5.4. Análises bioquímicas	45
3.5.4.1. Preparo das amostras sanguíneas.....	43
3.5.4.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	44
3.5.4.3. Determinação dos níveis de malondialdeído nos tecidos gástrico, hepático e plasmático.....	44
3.5.5. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa.....	46
3.6. Análise Estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Ensaio <i>in vitro</i>	49
4.1.1. Citotoxicidade.....	49
4.1.2. Ensaio de Morte Celular	51
4.1.2.1. Anexina V.....	50
4.1.2.2. Ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.....	53
4.1.2.3. Ensaio do "TUNEL".....	58
4.1.2.4. Avaliação da atividade da caspase-3.....	65
4.1.3. Avaliação do potencial Mutagênico – Ensaio do Micronúcleo.....	69
4.1.4. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	71
4.1.5. <i>Western blot</i> das proteínas AKT total, AKT fosforilada e caspase-3.....	73
4.2. Ensaio <i>in vivo</i>	78
4.2.1. Indução da Carcinogênese	78
4.2.2. Análise Macroscópica	84
4.2.3. Análise Microscópica	91
4.2.4. Avaliação do Índice Mitótico	107

4.2.5. Parâmetros Bioquímicos.....	109
4.2.5.1. Glicemia.....	104
4.2.5.2. Toxicidade Renal - Uréia e Creatinina.....	105
4.2.5.3. Toxicidade Hepática - AST/ALT/ALP.....	106
4.2.5.4. Níveis de malondialdeído - Fígado/Estômago/Rim/Coração e Plasma.....	108
4.2.6. Ensaio do Cometa.....	116
5. CONCLUSÕES:.....	121
REFERÊNCIAS	122

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Bucal

O câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão de tecidos e órgãos, podendo disseminar-se para outras regiões do organismo (metástase) (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Isso acontece quando as células cancerosas adquirem a capacidade de invadir e sobrevive na circulação (sanguínea ou linfática), desencadeando um conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular (WHO, 2015).

O mecanismo de biologia tumoral envolve ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, assim como a ativação de telomerase. Estas características adquiridas permitem que o tumor apresente a capacidade de se dividir indefinidamente e sem controle, além de somar novas mutações, uma vez o processo de reparo celular é afetado e como consequência, acumula mutações que levam a aquisição de novas características tumorais. Por outro lado, um tumor benigno demonstra mutações que propiciam o aumento de multiplicação, mas preserva a capacidade de corrigir erros e mutações genéticas, o que impossibilita, pelo menos enquanto neoplasia benigna, o acúmulo de novas mutações e a aquisição de novas características tumorais (KLATT et al. 2010; KUMAR et et al. 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, para o ano de 2030, 27 milhões de pessoas farão diagnóstico de câncer, e que neste mesmo ano, 17 milhões irão a óbito por essa doença. Além disso, estima-se que cerca de 75 milhões de pessoas estejam vivas anualmente após o diagnóstico de câncer. No Brasil, as estimativas para 2016/2017 apontam a ocorrência de aproximadamente 596.070 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Sem contar os casos de pele não melanoma, estima-se um total de 120.310 mil novos casos.

De acordo com um dos maiores centros oncológicos integrados do mundo (A.C. Camargo), aproximadamente 10% dos casos de câncer são hereditários. A grande maioria dos diagnósticos tem relação direta com fatores ambientais e hábitos de vida, como tabagismo, consumo excessivo de álcool, sedentarismo, alimentação inadequada e exposição exagerada ao sol ou a alguns micro-organismos.

Os carcinomas espinocelulares (CECs) são neoplasias malignas originadas do epitélio escamoso e podem ser diferenciados ou indiferenciados. Esses tumores podem ocorrer na pele (local mais frequente), boca, laringe, esôfago e colo uterino (CH'NG et al., 2006). Os cânceres de boca afetam lábio e o interior da cavidade oral e apresentam etiologias distintas. Os de lábio apresentam forte correlação com a exposição solar e os de cavidade bucal apresentam forte correlação com o tabagismo e alcoolismo (NEVILLE, 2009).

Esse tipo de câncer acomete mais homens acima de 40 anos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer de boca eram tabagistas, etilistas (consumo regular de bebidas alcoólicas) ou demonstravam a associação à presença do vírus HPV e também a radiação solar (câncer nos lábios). Entretanto, se faz necessário relatar que a etiologia do câncer de boca é multifatorial e a associação de fatores etiológicos demonstra sinergismo, como é o caso dos hábitos de fumar e beber, que quando associados, podem elevar para 35 vezes as chances de desenvolvimento de câncer bucal (BLOT et al., 1988).

As estimativas de novos casos de câncer na cavidade oral em 2016 foram de 15.490, sendo 11.140 para homens e 4.350 para mulheres, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Todavia, o diagnóstico precoce associado a adequado tratamento tem demonstrado taxas de sobrevida muito superiores à média de 50%, chegando a 80% ou 90% de sobrevida em cinco anos.

Na população da Índia, o câncer bucal constitui 19% do total de cânceres entre os homens, e é o terceiro mais comum entre as mulheres (SHARMA et al., 2011). Sem considerar os tumores de pele, o câncer da cavidade oral ocupa o quarto lugar na região sudeste para homens, e o décimo lugar para mulheres, de acordo com o INCA, como mostrado na tabela 1.

Como o câncer de cavidade oral é considerado um grave problema de saúde pública, devemos investir na busca de novas alternativas terapêuticas que possam apresentar alguma atividade promissora na eficiência contra esse tipo de câncer.

Tabela 1: Estimativa do número de novos casos na Região Sudeste.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	25.800	26,9%
Cólon e Reto	10.040	10,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	7.870	8,2%
Cavidade Oral	6.030	6,3%
Estômago	5.710	6,0%
Bexiga	4.160	4,3%
Esôfago	3.470	3,6%
Laringe	2.720	2,8%
Linfoma não Hodgkin	2.550	2,7%
Leucemias	2.480	2,6%
Sistema Nervoso Central	2.150	2,2%
Pele Melanoma	1.160	1,2%
Linfoma de Hodgkin	470	0,5%
Glândula Tireoide	160	0,2%
Todas as Neoplasias sem pele	95.900	
Todas as Neoplasias	134.330	



Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	29.760	30,3%
Cólon e Reto	9.910	10,1%
Colo do útero	4.940	5,0%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	4.620	4,7%
Corpo do útero	4.180	4,3%
Estômago	3.420	3,5%
Ovário	2.960	3,0%
Linfoma não Hodgkin	2.800	2,9%
Glândula Tireoide	2.680	2,7%
Cavidade Oral	2.300	2,3%
Sistema Nervoso Central	2.060	2,1%
Leucemias	1.950	2,0%
Esôfago	1.300	1,3%
Bexiga	1.280	1,3%
Pele Melanoma	1.100	1,1%
Linfoma de Hodgkin	500	0,5%
Laringe	300	0,3%
Todas as Neoplasias sem pele	98.100	
Todas as Neoplasias	156.760	

Legenda: Estimativas de câncer no Brasil, 2016. Fonte: Adaptado do INCA.

1.2. Produtos Naturais e o Câncer

Um avanço significativo na pesquisa de produtos naturais foi observado no século XX, especialmente de plantas e microrganismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas na terapêutica oncológica. Nas últimas décadas, a maioria dos fármacos antineoplásicos introduzidos na terapêutica tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN et al. 2007; BUTLER et al. 2008; HARVEY et al. 2008).

Dessa maneira, em nosso estudo buscamos encontrar um alvo promissor contra tipos de câncer da cavidade oral em uma planta típica do cerrado brasileiro, *Pterogyne nitens* Tulasne (figura 1), pertencente à família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae, que representa uma fonte de inúmeros alcaloides guanidínicos e flavonoides (BOLZANI et al., 1995). Embora não haja muitos relatos de usos medicinais desta espécie, a população da argentina utilizou cascas do caule de *P. nitens* para tratar *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007). Vários artigos têm relatado que esses alcaloides possuem diferentes atividades biológicas, tais como; citotóxicas, antimutagênicas, antifúngicas, pró-apoptóticas e antibacterianas (REGASINI et al. 2009; BOLZANI et al. 1995; DUARTE et al. 2010; COQUEIRO et al. 2014).

O estudo sobre a composição química das flores de *P. nitens* foi bastante significativo para o registro do perfil metabólico da espécie. Desse estudo foram isolados e identificados onze constituintes; quatro flavonóides, quatro derivados do

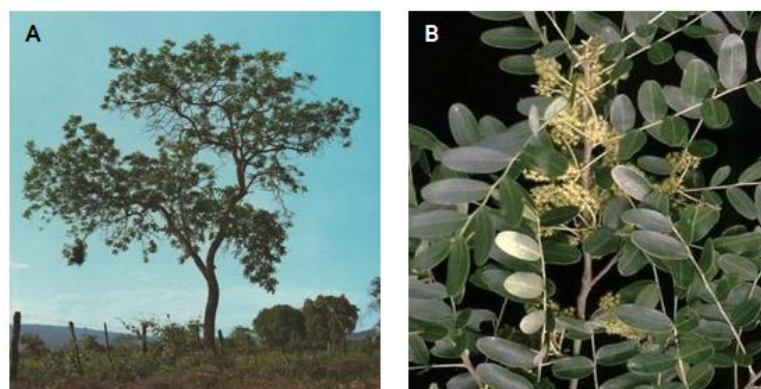
ácido cinâmico, dois alcaloides guanidínicos e o ácido gálico (REGASINI et al., 2008 a; REGASINI et al., 2008 b).

Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcaloides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais demonstraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo supostamente apresentar ação antitumoral (BOLZANI et al, 1995). Ainda, frações obtidas do extrato etanólico de *P. nitens* apresentaram atividade antioxidante (VELLOSA, 2005), demonstraram um potencial importante contra espécies reativas de oxigênio (PASQUINI NETTO et al. 2012) e ação antifúngica (REGASINI et al., 2010).

Popularmente, *P. nitens* é conhecida como “amendoim”, “amendoim-bravo”, “viraró”, “madeira-nova”, “pau-amendoim”, “óleo-branco”, “pau-de-fava”, “bálsamo” (FERNANDES et al., 2008; REGASINI et al., 2008a). A madeira do “amendoim-bravo” apresenta-se moderadamente densa e relativa resistência física, sendo amplamente empregada na construção civil (CARVALHO, 1994; COLETTI et al., 2010).

Contudo, esta espécie possui valor ornamental muito grande, não somente pela beleza e odor de suas flores, bem como de sua folhagem brilhante e frutificação, que apresenta tons variáveis à medida que amadurecem, sendo recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e, na reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas (LORENZI, 2000b; TONIN et al., 2005, REGASINI et al., 2008).

Figura 1: Planta *Pterogyne nitens* em seu habitat

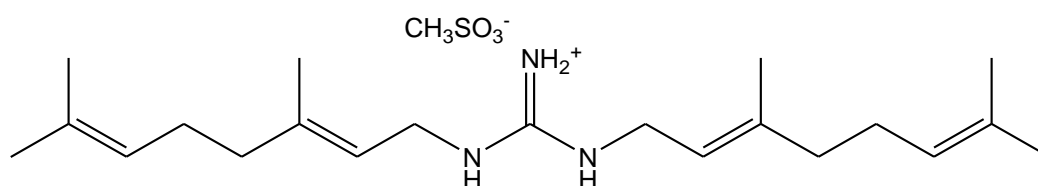


Legenda: (A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas e flores (LORENZI, 2000).

1.2.1. Nitensidina A

Com o intuito de buscar agentes antitumorais em elementos da biodiversidade, foram obtidos os alcaloides guanidínicos de *P. nitens*, denominados de nitensidinas A-E. Esses alcaloides apresentam-se substituídos por unidades terpênicas, tais como isoprenilas e geranilas (REGASINI, 2008). No presente estudo foi utilizado o alcaloide denominado nitensidina A, com a estrutura química apresentada na figura 2.

Figura 2: Fórmula estrutural da nitensidina A



Legenda: Fórmula estrutural do metanossulfonato de nitensidina A demonstrando seu núcleo guanidínico (REGASINI, 2008).

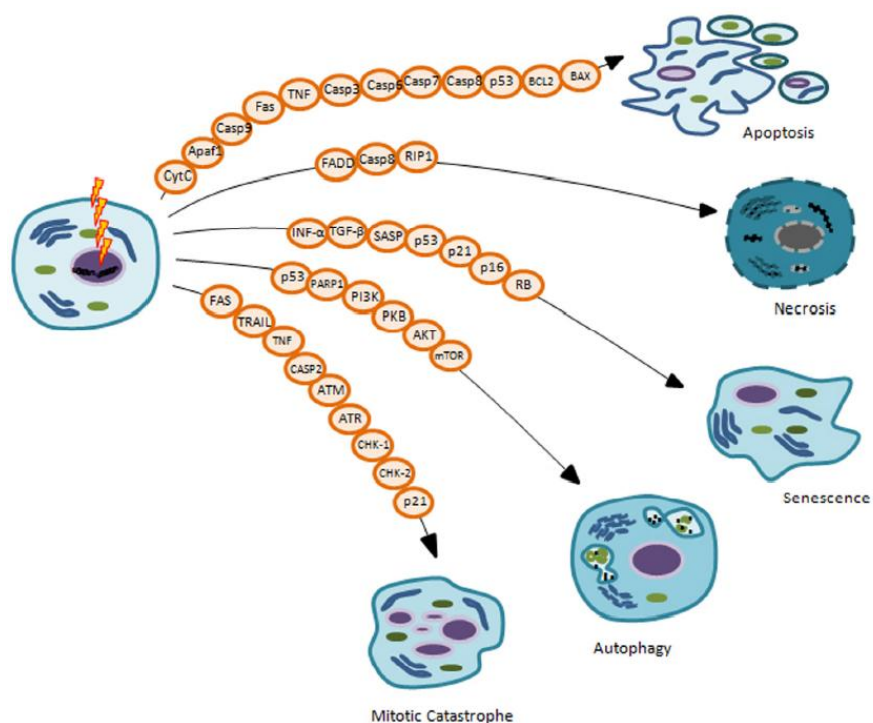
Estudos com alcaloides guanidínicos pteroginina e pteroginidina isolados de *Pterogyne nitens* demonstraram indução de apoptose e/ou necrose em células humanas de carcinoma epitelial (ZR 7531), denotando atividade antineoplásica por morte celular programada (DUARTE et al., 2010). O alcaloide guanidínico nitensidina B, (análogo da nitensidina A) também demonstrou atividade antineoplásica em linhagem de câncer de colo uterino (SiHa) por indução de apoptose (SOUZA, 2012). Ainda, o alcaloide nitensidina A, demonstrou por Sorbo (2011), que esse composto possui atividade citotóxica em linhagens de câncer de colo de útero imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C-33A), sugerindo também uma possível atividade antitumoral em estudos *in vivo* com camundongos *nude* BALB/c. Além disso, um estudo realizado entre quatro guanidinas: galegina, pteroginina, pteroginidina e nitensidina A, pteroginina e nitensidina A reduziram o número de osteoclastos, uma célula móvel, gigante, multinucleada e extensamente ramificada (TAJIMA et al. 2015).

Dessa maneira, fez-se necessária a realização de experimentos que evidenciassem a atividade do composto nitensidina A, frente à linhagem de carcinoma epidemóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat), avaliando sua atividade citotóxica e o tipo de morte celular envolvido.

1.3. Morte Celular

Atualmente, os processos de morte podem ser classificados de acordo com características morfológicas e bioquímicas. Classicamente, são várias formas de morte celular, como: apoptose, necrose, autofagia e ainda processos que podem levar a morte das células como a senescência, a mitose catastrófica, dentre outros (CASTEDO et al., 2004). A figura 3 ilustra alguns desses mecanismos de morte celular as quais envolvem aspectos morfológicos, etiologias e ativação de enzimas específicas.

Figura 3: Tipos de morte celular



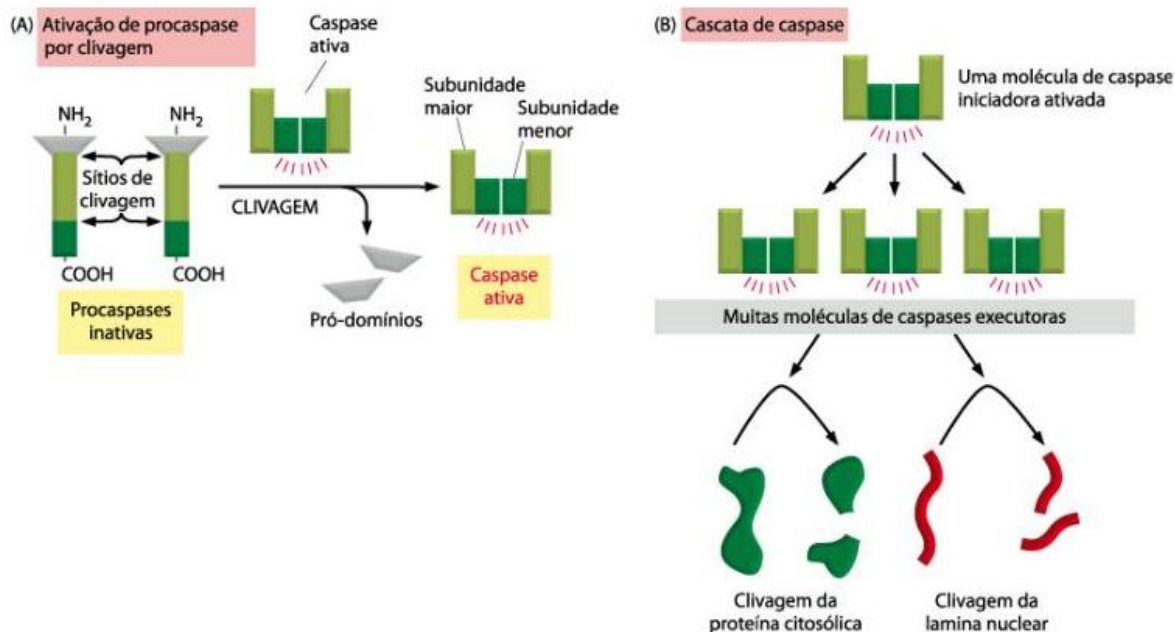
Legenda: Mecanismos de morte celular induzidos por radiação.
Fonte: Minafra & Bravata, 2014.

1.3.1. Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular altamente regulado, que complementa a mitose e o crescimento celular. É desencadeada por excesso ou falta de estímulos de crescimento, proliferação e até mesmo dano celular. Portanto, é considerada de fundamental importância para o controle do crescimento de órgãos e tecidos e na manutenção da vida (BRAS et al, 2005). A célula em apoptose caracteriza-se por uma diminuição no tamanho, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando ao aparecimento de núcleo picnótico, formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria e complexo de golgi, mas sem resposta inflamatória. Isso demonstra que a mitocôndria coordena os sinais de morte celular (NIKOLETOPOULOU, 2013). Por fim, ocorre uma desintegração controlada da membrana formando os corpos apoptóticos (FUCHS & STELLER, 2011).

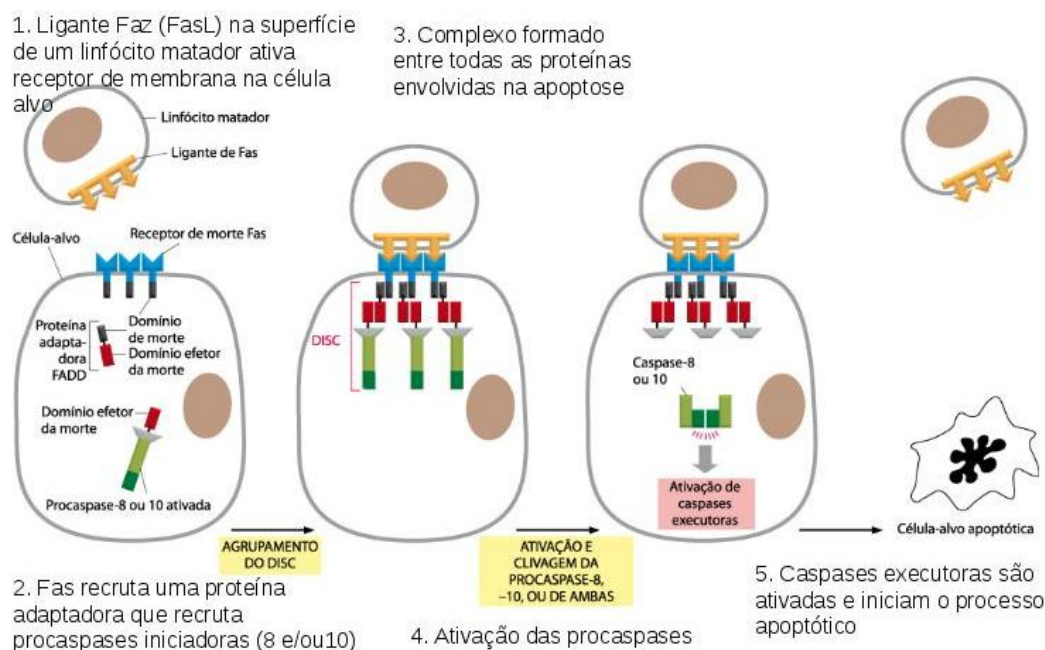
A ativação de caspases (figura 4) caracteriza a apoptose, estas intercedem à clivagem de proteínas celulares vitais (KERR et al. 1995). As caspases são sintetizadas nas células como precursores inativos ou procaspases, os quais são tipicamente ativadas por clivagem proteolítica (ALBERTS 2010). Algumas das procaspases agem no início da cascata proteolítica, e são chamadas de procaspases iniciadoras, quando ativadas elas clivam e ativam procaspases executoras, assim como proteínas-alvo específicas nas células. Para que esse processo ocorra duas vias estão envolvidas na ativação da cascata de caspase, a via extrínseca e a intrínseca (RADOGNA et al. 2015).

Figura 4: Ativação da procaspase durante a apoptose.



Legenda: A) Ativação de procaspase por clivagem. B) Cascata de caspase.
Fonte: Alberts, 2010.

A via extrínseca da apoptose é disparada quando proteínas de sinalização extracelular ligam-se a receptores de morte, como o FAS e o fator de necrose tumoral (TNF), na superfície celular. O estímulo do ligante de morte resulta na ativação de FAS na superfície da célula alvo pelo ligante FAS na superfície de um linfócito, por exemplo. Quando ativados pela ligação ao ligante FAS os domínios de morte recrutam proteínas adaptadoras intracelulares, que por sua vez, recrutam procaspases iniciadoras (8-10), formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (ALBERTS 2010). A ativação da procaspase 8-10 no DISC é seguida pela ativação de caspases efetoras, incluindo as caspases 3, 6, e 7, que atuam como efetoras do programa de morte celular, no qual uma vez ativado induz a fragmentação do DNA e apoptose (RADOGNA et al. 2015). O esquema da via extrínseca está demonstrado na figura 5.

Figura 5: Via extrínseca da apoptose

A via intrínseca da apoptose depende da mitocôndria e é ativada por sinais intracelulares de morte, tais como danos no DNA, fatores de crescimento e estresse oxidativo (RADOGNA et al. 2015). A ativação da apoptose pode ocorrer no interior das células, geralmente em resposta a injúria, estresses, como quebra de DNA ou falta de oxigênio, nutrientes ou sinais de sobrevivência extracelulares, esse mecanismo depende da liberação no citosol de proteínas mitocondriais que normalmente residem no espaço intermembranas dessas organelas. Algumas das proteínas liberadas ativam a cascata proteolítica da caspase no citoplasma, levando a apoptose (ALBERTS 2010).

O citocromo c, que é uma proteína liberada na mitocôndria, quando liberado no citosol liga-se a proteína adaptadora de ativação da procaspase APAF1, provocando a oligomerização de APAF1 em um heptamero arredondado chamado apoptossomo. As proteínas APAF1 no apoptossomo recrutam as proteínas procaspases iniciadoras (9), na qual são ativadas pela proximidade ao apoptossomo, ativando assim as procaspases executoras para indução da apoptose. Em algumas células, a via extrínseca (figura 6) deve recrutar a via intrínseca para amplificação do sinal apoptótico, para assim matar as células, isso ocorre pela ativação de um membro da família de proteínas BCL2 (ALBERTS 2010).

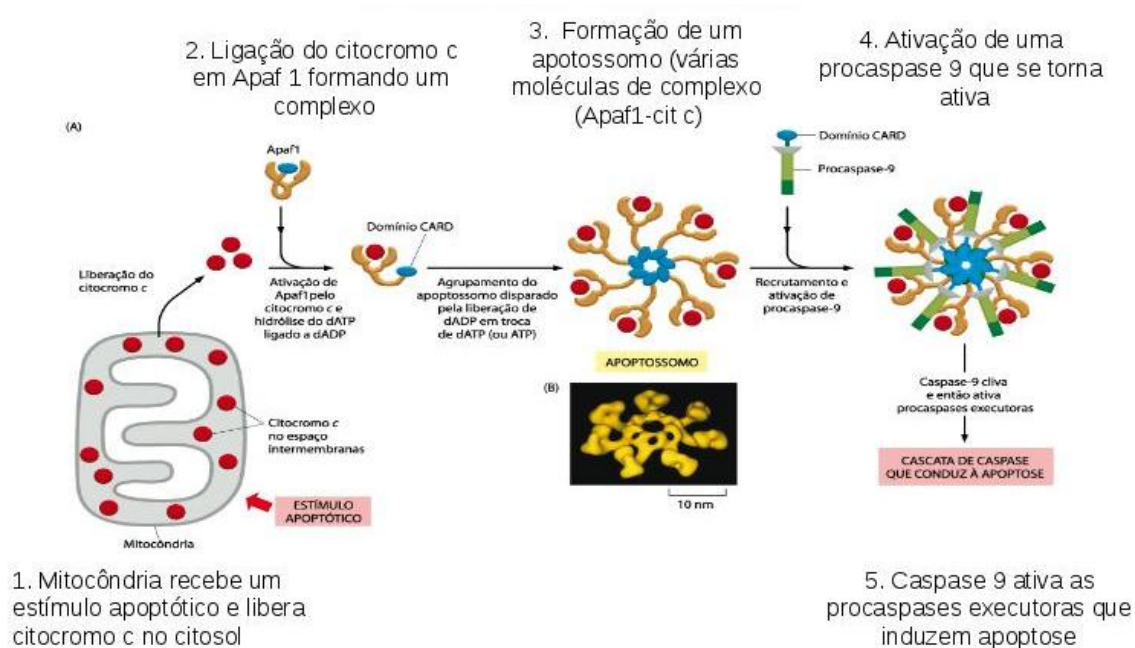
Figura 6: Via intrínseca da apoptose

Figura 6: A via intrínseca da apoptose.
 Fonte: Modificado de Alberts, 2010

1.3.2. Necrose

O processo causado por um estímulo intenso que resulta na perda de controle por parte da célula, rápida interrupção dos processos de manutenção da integridade celular, rompimento da membrana plasmática, destruição do citoplasma e, como consequência, na morte da célula, é chamado de necrose (BRAS et al., 2005), que pode ser definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia e que ocorre espontaneamente em neoplasias quando a proliferação celular supera a angiogênese (HOTCHKISS et al. 2009), e apesar de ser normalmente tida como um processo desordenado, estudos demonstram que a necrose é controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (PETER, 2011; WOLPAW et al. 2011). Nesse processo ocorre o rompimento de organelas e da membrana plasmática e também a liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD et al., 2007, KERR et al., 1995). Mesmo que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos, mas ao contrario da apoptose, na necrose geralmente não há sinais de fragmentação do DNA (KERR et al., 1995).

A proteína que interage com receptor de morte (RIP), bem como o fator 2 associado ao receptor de TNF, são importantes reguladores da necrose celular induzida por receptores de morte (HOLLER et al. 2000; LIN et al. 2004). Quando RIP é ativada, é translocada para a mitocôndria e promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e depleção de ATP (TEMKIN et al. 2006).

Outra via que reduz a produção de ATP em células com DNA danificado envolve a ativação da poli-ADP-ribose polimerase a qual depleta o cofator da glicólise NAD⁺ (ZONG et al. 2004). O subsequente aumento do conteúdo intracelular de cálcio e de espécies reativas de oxigênio promove a ativação de calpaínas, proteases citoplasmáticas, e de fosfolipase A2. A proteólise e a peroxidação das membranas que resultam da atividade dessas enzimas levam à permeabilização da célula e à morte por necrose (AMARAVADI & THOMPSON, 2007).

1.3.3. Senescência

A senescência é um processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento, no qual a divisão celular é bloqueada de maneira irreversível, mas as células permanecem metabolicamente ativas. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais (SINGH et al. 2010). As células que entram em senescência perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares (GRIVICICH, 2007). Alterações de expressão, tais como a expressão desregulada do ciclo celular induzindo parada, supra regulação de fatores que anti apoptóticos, níveis de expressão elevados de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e proteases são características que podem definir o processo de senescência (TOMINAGA & PEREIRA-SMITH, 2012).

1.3.4. Autofagia

A autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente, envolvida na manutenção da função celular ao destruir estruturas desgastadas ou mal formadas, no qual ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares em células tumorais que sofrem hipóxia crônica e esgotamento de nutrientes, o processo de autofagia é uma estratégia para manter a homeostase metabólica (HOTCHKISS et al. 2009; PETER, 2011). Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos que irão se fundir com os lisossomos. A seguir, o conteúdo dos autofagossomos será degradado pelas hidrolases lisossômicas (NIKOLETOPOULOU, 2013). A autofagia também pode ser desencadeada por inúmeros tipos de estresse metabólico ou terapêutico como o bloqueio de vias de sinalização de fatores de crescimento, a supressão do crescimento de tumor, a eliminação de substâncias tóxicas, eliminação intracelular de micro-organismos (HOTCHKISS et al. 2009), o acúmulo de cálcio intracelular (HOYER-HANSEN et al. 2007) e de espécies reativas de oxigênio (SCHERZ-SHOVAL et al. 2007).

1.3.5. Catástrofe Mitótica

O processo de morte celular conhecido por catástrofe mitótica ocorre durante a mitose (metáfase) como resultado da deficiente ativação do checkpoint, mecanismo celular que protege a célula contra a aneuploidização e, conseqüentemente, a instabilidade cromossômica, característica das células tumorais (CASTELO, 2004). Esse processo resulta da tentativa de divisão de células com DNA danificado (BRUIN & MEDEMA, 2008). Sabe-se que a presença de danos no DNA promove bloqueio do ciclo celular. Quando esse bloqueio não é eficiente e células com DNA danificado entram em mitose, ocorre morte por catástrofe mitótica (RONINSON et al. 2001). Do ponto de vista morfológico, observa-se a presença de células gigantes, multinucleadas e com cromossomos descondensados (SINGH et al. 2010). A catástrofe mitótica pode ocorrer após exposição a fármacos que induzem hiperpolimerização de microtúbulos, como os taxanos, ou que causam despolimerização, como os alcaloides vincristina e vimblastina (CASTEDO et al. 2004a). A catástrofe mitótica pode estar relacionada

diretamente com a morte celular por apoptose e necrose, pois diferentes tipos celulares entram em apoptose em consequência da catástrofe mitótica (RONINSON et al. 2001) podendo também resultar em morte celular por necrose (MANSILLA et al. 2006; VAKIFAHMETOGLU et al. 2008). Embora o processo de catástrofe mitótica tem mostrado varias características bioquímicas da apoptose, incluindo a permeabilização da membrana mitocondrial e ativação de caspase, tem sido observado que esse processo de morte pode exigir mecanismos de caspase tanto dependentes quanto independentes (CASTEDO et al. 2004).

Entretanto, embora os experimentos *in vitro* propiciem uma visão aprofundada do efeito de uma certa substância a uma determinada linhagem de células, devemos levar em consideração que a característica “controlada” dos estudos *in vitro* possa distanciar demasiadamente os resultados obtidos das aplicações clínicas. Sendo assim, é de boa norma realizar o salto científico utilizando modelos animais, que propiciem uma visão mais próxima das condições clínicas da ação de um composto. Foi nesse sentido que buscamos trabalhar com o modelo de carcinogênese experimental usando o 4NQO. Esse modelo é muito utilizado para simular a carcinogênese oral assemelhando-se as condições clínicas dos pacientes que apresentam esse tipo de doença.

1.4. Carcinogênese Experimental

O estudo da carcinogênese bucal experimental teve início na década de 1910. Em 1918, Yamagiwa e Ichikawa, publicaram artigo descrevendo estudo experimental da patogênese do carcinoma. Os estudos de carcinogênese bucal experimental, especificamente com glândulas salivares animais, utilizando hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), somente ocorreram em 1942, com Steiner (EL-MOFTY, 1977). A partir destas observações, os HPAs foram considerados um grupo de compostos oncogênicos, dos quais se destacam o dimetilbenzotraceno (DMBA), o metilcolantreno, o benzopireno e o óxido de nitroquinolona (4NQO) como principais exemplos (BRASILEIRO et al. 2000).

O modelo de carcinogênese animal induzida por 4NQO tem sido amplamente utilizado, devido ao fato desta substância apresentar ação sobre diversos órgãos, incluindo a indução do carcinoma de células escamosas (SCC) na língua e palato (KANOJIA & VAIDYA, 2006).

O 4NQO, é um agente sintético, derivado da quinolona, sintetizado em 1943 por Ochiai et al. (1945), solúvel em água e sensível a altas temperaturas e a luz. Seus efeitos carcinogênicos são decorrentes da redução enzimática do grupamento nitro, ligado ao anel aromático, seguida da formação de um composto intermediário conhecido como óxido de 4-hidroxi-aminoquinolona (4HAQO). Estudos *in vitro* demonstram que o 4HAQO promove a geração de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais induzem um forte estresse oxidativo intracelular, culminando na formação de mutações em bases nitrogenadas, deleções e conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (TANAKA et al., 2002).

O 4NQO pode ser administrado oralmente, na água de beber dos animais, sendo de fácil aplicação. Este modelo tem sido amplamente explorado, pois, além de apresentar alta efetividade carcinogênica, possui grande semelhança com a carcinogênese humana, uma vez que a droga é capaz de induzir a carcinogênese em estágios sequenciais, mimetizando alterações histológicas e moleculares que ocorrem em humanos durante os processos tumorigênicos, o que resulta na formação de tumores diferenciados. Com este modelo é possível ainda controlar as condições experimentais, garantindo a reprodutibilidade dos dados, com poucas variações, em todos os estágios da carcinogênese, e por isso, permite a inclusão de intervenções durante a progressão neoplásica, assim como a identificação de estágios que antecedem a instalação da neoplasia (SUN et al. 2010).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo, verificar a atividade antitumoral e mutagênica de nitensidina A, por meio de experimentos *in vitro* (linhagem de CEC oral) e *in vivo*, empregando modelo de indução por 4NQO em ratos (*Rattus norvegicus albinos*, Holtzman).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade e determinar a concentração inibitória de 50 % das células (CI₅₀), na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat), por meio do ensaio de sulforrodamina B (SRB);
- Avaliar a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de anexina V conjugada com FITC na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat);
- Avaliar a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de exclusão de fluorocromos (Hoechst e iodeto de propídeo), na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat);
- Avaliar quantitativamente sinais intracelulares de ativação da apoptose, utilizando o método do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat);
- Avaliar a atividade da Caspase-3 na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat);
- Avaliar a mutagenicidade através do ensaio do Micronúcleo na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat);
- Verificar a indução de estresse oxidativo na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat) por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar as alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação das proteínas AKT, p-Ser-473-AKT e caspase-3 por meio de western blot;

- Realizar o modelo de carcinogênese experimental em ratos, por meio da indução com óxido 4-nitroquinolina (4NQO);
- Analisar os locais de invasão do tumor nos ratos, bem como avaliar o índice mitótico e necrose dos tumores, por meio de análise histológica;
- Avaliar o efeito dos parâmetros bioquímicos (glicemia; níveis séricos de ureia, creatinina e das enzimas AST, ALT, e ALP), antes, durante e depois do tratamento com nitensidina A, nos ratos;
- Avaliar o nível de estresse oxidativo tecidual, no fígado, estômago, rim, coração e plasma dos animais, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), após a indução com 4NQO e com nitensidina A;
- Detectar danos precoces de DNA no sangue caudal de ratos, para avaliação de genotoxicidade por meio do teste do cometa, antes, durante e depois do tratamento com nitensidina A.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos Fitoquímicos: Obtenção de Nitensidina A

O processo de obtenção do alcaloide guanidínico, nitensidina A, foi realizado nas dependências do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP- São José do Rio Preto) sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini.

As folhas foram coletadas no Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil, entre os meses de abril e maio de 2003, pela Dra. Maria Cláudia Marx Young e identificado como sendo *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) pela Dra. Inês Cordeiro do mesmo instituto. Uma exsicata (SP204319) encontra-se depositada no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil.

O material botânico foi seco à temperatura ambiente e então submetido à moagem empregando moinho de facas. O pó obtido foi levado à maceração empregando hexanos e com posterior maceração em etanol. O extrato etanólico foi dissolvido em mistura metanol:água (7:3) e seguido de extração líquido-líquido empregando-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, obtendo-se três frações.

A fração *n*-butanólica foi acidificada com CH₃SO₃H aquoso (25 %) e levada à partição líquido-líquido em CHCl₃. A fração clorofórmica foi descartada e a fração aquosa foi tratada com NH₄OH até pH 7 e novamente submetida à partição líquido-líquido em CHCl₃. A fração clorofórmica foi evaporada, obtendo-se a fração alcaloídica.

A fração alcaloídica foi cromatografada por sucessivas colunas de gel de sílica, eluídas em CHCl₃:MeOH (0-25% de MeOH), obtendo-se o metanossulfonato de nitensidina A, o qual teve sua estrutura molecular identificada por técnicas espectroscópica, tais como: RMN de ¹H e RMN de ¹³C.

3.2. Cultura de Células

O efeito citotóxico, de morte celular, mutagênico, de indução ao estresse oxidativo e as alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação das proteínas, de nitensidina A foi avaliado na linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3: JCRB:JCR0623) e na linhagem de queratinócito humano imortalizado (HaCat: CLS 300493). As linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Della Coleta (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP). A linhagem HSC-3 foi cultivada em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F12 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma), 10 % de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil), hidrocortisona (0,4µg/L) e ácido ascórbico (50mg/L) e a linhagem HaCat foi cultivada em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma), 10 % de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura, mantidas a 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose, H₂O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas acrescentado-se 1 mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento do aglomerado celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10 % de soro fetal bovino. A suspensão celular

obtida em um frasco foi transferida para outros frascos, de modo a obter 10^5 células/frasco, ou a quantia necessária para realização de cada teste. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.3. Tratamento das Linhagens celulares e dos Animais

Para o ensaio de citotoxicidade - sulforrodamina B (SRB) as células foram tratadas por diferentes concentrações (3,6 μM à 116,9 μM) de nitensidina A para calcular o CI_{50} , como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina 45,5 μM e como controle de veículo o meio de cultura contendo 1 % de DMSO (v/v).

O alcalóide guanidínico nitensidina A foi utilizado em diferentes concentrações. Nos ensaios de morte celular (Anexina V, exclusão de fluorocromos, TUNEL e ativação da caspase-3), foram utilizadas três concentrações citotóxicas: 7,3; 14,6; 29,2 μM , como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina 45,5 μM e a curcumina 100 μM , como controle de veículo o meio de cultura contendo 1 % de DMSO (v/v). Para o ensaio de mutagenicidade (Micronúcleo) foram utilizadas concentrações não citotóxicas: 0,9; 1,8; 3,6 μM e para o ensaio de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico também foram utilizadas concentrações não citotóxicas: 1,8 e 3,6 μM . Nos ensaios de western blot, utilizamos concentrações não citotóxicas: 0,9 e 1,8 μM de nitensidina A. Todos os testes foram realizados com três experimentos independentes em três replicatas.

Para os experimentos *in vivo* as doses utilizadas foram de 2 mg/kg p.c.; 10 mg/kg p.c. e 50 mg/kg p.c. de nitensidina A, concentrações pré estabelecidas por meio de ensaios realizados anteriormente (SORBO, 2011). Como controle positivo foi utilizado animais expostos ao agente indutor 4NQO (tratados com DMSO 1%) e como controle negativo foram utilizados animais sem tratamento nenhum e sem indução tumoral. O tratamento foi realizado via intraperitoneal (*i.p.*), durante 8 semanas, com intervalo de um dia a cada aplicação.

3.4. Ensaios *in vitro*

3.4.1. Citotoxicidade com Sulforrodamina B (SRB)

Sulforrodamina B (SRB), é um corante aniônico que se liga a resíduos básicos de aminoácidos, e conseqüentemente cora as proteínas celulares, facilitando sua quantificação espectrofotométrica (SKEHAN et al., 1990).

Para determinação da citotoxicidade (CI₅₀) e seletividade sobre as linhagens, as células foram cultivadas em placas de cultura de células de 96 poços, na concentração de 8×10^3 células/poço, em estufa a 37 °C com atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas, antes dos tratamentos com as amostras. Após esse período, foram tratadas com nintensidina A, incubadas nas mesmas condições de cultivo durante 24 horas.

Após a incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% (m/v) por 60 minutos a 4 °C. Após a fixação, as placas foram lavadas com água destilada, e secas em temperatura ambiente. As células foram coradas com SRB 0,4% (diluída em ácido acético 1%) durante 30 minutos, e posteriormente lavadas com ácido acético 1%. Após a secagem das placas, o corante ligado a proteínas das células foi solubilizado com solução Tris-base 10 mM (pH 10,5), sob agitação durante 5 minutos. E então a absorbância foi medida a 570 nm (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005).

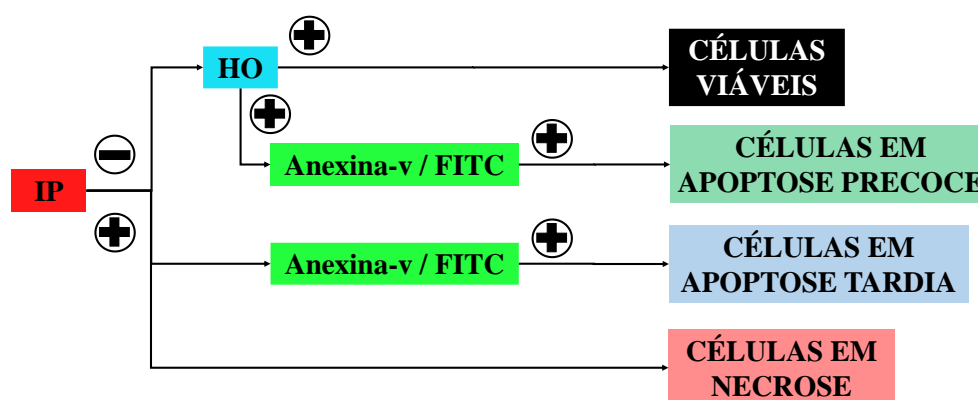
3.4.2. Ensaios de Morte Celular

3.4.2.1. Anexina V

Para o ensaio de apoptose por anexina V, foram plaqueadas 5×10^3 células/poço e cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas para a formação da monocamada confluyente. Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos, e tem alta afinidade por fosfatidilserina, que em células apoptóticas está translocada para a superfície externa da bicamada lipídica da membrana plasmática. Desta maneira, as mudanças na assimetria da membrana, correspondentes ao grau de aderência de anexina-V aos fosfolipídeos da membrana celular, associadas ao início da apoptose podem ser detectadas antes da perda da integridade da membrana e do aparecimento de alterações morfológicas (KOOPTMAN et.al., 1994).

Depois do crescimento celular, estas foram tratadas (12 e 24 horas) nas concentrações pré-estabelecidas por meio do ensaio de citotoxicidade. O ensaio de anexina-V foi realizado segundo DUARTE et al., 2010, com as modificações necessárias para utilização do equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). Em seguida, a placa foi centrifugada a 2.500 RPM, cada poço foi lavado com PBS 1X e centrifugadas novamente. O PBS 1X foi retirado e foi adicionado 100 μL /poço de tampão de ligação (HEPES 10mM, NaCl 140 mM e CaCl_2 2,5 mM), contendo 1,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anexina V conjugada com FITC (*Life Technologies*[®]), e 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoechst 33342 (*Invitrogen*[®]) (1mg/mL), sendo incubadas por 15 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após os 15 minutos, foi adicionado 20 μL de iodeto de propídeo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão de ligação. As imagens foram adquiridas e analisadas pelo software, como mostrado na figura 7, utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), nas dependências do Laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Figura 7. Fluxograma de análise do ensaio de anexina-V.



Legenda: Células viáveis: coloração com HO. Células em apoptose precoce: marcadas com anexina-V/FITC e coloração com HO. Células em apoptose tardia: marcadas com anexina-V/FITC e coloração com IP. Células em necrose: coloração com PI.

3.4.2.2. Ensaio citomorfológico de exclusão de fluorocromos (Hoechst e iodeto de propídeo - HO/IP)

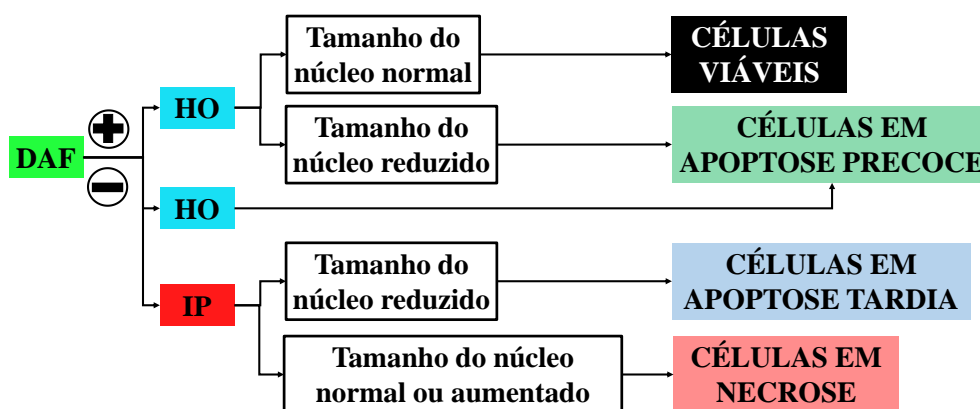
Para o ensaio de exclusão de fluorocromos, foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços (100 μL /poço) e tratadas por 12 e 24h.

A distinção entre células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão de fluorocromos, utilizando-se uma solução contendo diacetato de fluoresceína

3,5 $\mu\text{g/mL}$ (DAF), iodeto de propídeo 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (IP), e Hoechst 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (HO) 33342 (Invitrogen®). O iodeto de propídeo é uma molécula de alta massa molecular que se intercala no DNA de células com a membrana plasmática permeável. Por outro lado, o Hoechst 33342 é um corante fluorescente de DNA, rapidamente absorvido por células com a membrana plasmática íntegra (viáveis ou em estágios precoces de apoptose). O diacetato de fluoresceína é um corante fluorescente que cora o citoplasma de células que ainda mantém a integridade e função da membrana plasmática. Assim, a combinação destes corantes fluorescentes permite diferenciar os estágios de apoptose (precoce ou tardia), bem como apoptose de necrose (CIANCIO et al., 1988). O ensaio de exclusão de fluorocromos foi realizado segundo HASHIMOTO et al., 2003, com as modificações necessárias para utilização do equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare).

Após o tratamento com nitensidina A, a placa foi centrifugada a 2.500 RPM, cada poço foi lavado com PBS 1X e centrifugadas novamente. O PBS 1X foi retirado e foi adicionado 100 μL /poço de solução de fluorocromos e a placa incubada por 10 minutos ao abrigo da luz. Depois do período de incubação, as imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), pelo software, como mostrado na figura 8, nas dependências do Laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Figura 8. Fluxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.



Legenda: Células viáveis: coloração com DAF e HO e tamanho nuclear normal. Células em apoptose precoce: coloração com DAF e HO, com núcleo reduzido ou apenas coloração com HO. Células em apoptose tardia: coloração com IP e núcleo reduzido. Células em necrose: coloração com PI e núcleo normal ou aumentado.

3.4.2.3. TUNEL

TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling, é um método de identificação e quantificação de células apoptóticas em cultura celular. Baseia-se na ligação de dUTP conjugado com substância fluorescente nas extremidades de DNA internucleossomal fragmentado, catalizada pela enzima desoxinucleotidil transferase (TdT). As células foram tripsinizadas, plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e depois foram tratadas nas concentrações de nitensidina A por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas e fixadas com solução de paraformaldeído (4%) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.

Após a incubação acima, as células foram lavadas e foi adicionado uma solução de permeabilização (Triton X-100 e citrato de sódio, 0,01%) em banho de gelo por 30 minutos. Após o banho de gelo, mais uma vez as células foram lavadas e foi adicionado uma solução de bloqueio composta por Albumina sérica bovina, soro fetal bovino e tampão fosfato, as células foram incubadas a 37°C por 1 hora e por fim foram adicionados 50 microlitros da mistura TUNEL (Kit ROCHE, in situ cell death kit) e incubação a 37°C em câmara úmida. Após a incubação foram adicionados mais 100 microlitros de PBS e para a leitura foi utilizado o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare) nas dependências do Laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, onde a contagem de células marcadas com fluorescência foi realizada em todas as células analisáveis, em doze campos por poço (PITANGUI et al. 2016).

3.4.2.4. Avaliação da atividade da caspase-3

Este ensaio teve como objetivo analisar a participação efetiva da caspase-3 na indução de morte celular programada (via intrínseca da apoptose). Para verificar o nível da ativação da caspase-3, as células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços (24 horas). Após o tratamento (6 horas) a placa foi centrifugada a 2.500 RPM, cada poço foi lavado com PBS 1X e centrifugadas novamente. Após a lavagem as células foram permeabilizadas, com solução de saponina 0,5% (dissolvida em meio de cultura contendo ditiotreitól - DTT a 5mM e EDTA a 2Mm) por 10 minutos. Após a

etapa de permeabilização, foram adicionados 100µL da solução de substrato fluorogênico (Ac-asp-met-gln-asp-AMC) específico para caspase-3 (20µM concentração final) – Sigma Aldrich® e iodeto de propídeo (2,5 µg/mL) para marcação nuclear. As imagens foram imediatamente adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), nas dependências do laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da intensidade de fluorescência emitida pela clivagem do substrato fluorogênico (EARNSHAW, 1999).

3.4.3. Avaliação do Potencial Mutagênico - Ensaio do Micronúcleo

O ensaio do micronúcleo foi utilizado para detectar danos irreparáveis ao DNA, durante o processo de divisão celular (FENECH, 2000).

A avaliação da mutagenicidade foi realizada a partir do ensaio do micronúcleo, com adaptações necessárias para utilização de microscopia de fluorescência no equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). Foram plaqueadas 4×10^3 células/poço em placas de 96 poços, por 24 horas. Os tratamentos foram realizados por 24h. Após o período de tratamento, os poços foram lavados com PBS e as células foram incubadas com citocalasina B (6µg/mL), por 36 horas a 37°C, para bloquear a etapa de citocinese da divisão celular, permitindo a observação de células multinucleadas (com dois ou mais núcleos). Após esta etapa, as células foram fixadas com etanol absoluto, por 30 minutos, e coradas com Isotiocianato de fluoresceína (FITC), 1µg/mL, por 1 hora, para coloração do citoplasma e em seguida com Hoechst 33342 (10µg/mL), por 30 minutos, para coloração do núcleo e micronúcleos. Imediatamente após a coloração, As imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare), nas dependências do laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. A frequência de micronúcleos foi obtida com o auxílio do software do equipamento a partir da contagem de micronúcleos em todas as células analisáveis, em doze campos por poço (SHIBAI-OGATA et al., 2011).

3.4.4. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no meio de cultura extracelular foi utilizada como indicador de estresse oxidativo. As células foram plaqueadas (2×10^5 células/poço) em placas de 24 poços, com tempo de crescimento de 24 horas, e tratadas por 24 horas. Após o tratamento, o meio de cultura de cada poço (200 μ L) foi utilizado para quantificação de TBARS, a partir da reação com 800 μ L de ácido tiobarbitúrico (0,8% - m/v) diluído em ácido acético (20% - v/v) e dodecil sulfato de sódio (8,1% - m/v). Após a mistura dos reagentes, os tubos foram incubados a 95°C, por 60 minutos, e a intensidade de fluorescência foi medida a 510 nm de excitação e 553 nm de emissão. Os resultados foram expressos em μ M de malondialdeído (MDA), quantificado a partir de uma curva padrão realizada com tetrametoxipropano (ZAMRI et al. 2014).

3.4.5. Análises de *Western blot*

Para detecção na mudança nos níveis de expressão de caspase-3, Akt e Akt fosforilada, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços (8×10^5 células/poço), por 24 horas, e tratadas com diferentes concentrações das amostras (24 horas). Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e lisadas com solução de lise contendo Tris 125mM (pH 6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (m/v), β -mercaptoetanol a 1% (v/v), inibidores de proteases (5 μ g/mL de aprotinina; 1 mM de PMSF; 2,34 mM de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio e 10 mM de ortovanadato de sódio). Após a lise, o conteúdo celular foi aquecido a 95°C por 8 minutos, e as amostras estocadas a -80°C até o momento do uso, uma alíquota foi separada para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). As proteínas dos lisados celulares foram separados por eletroforese tipo SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida a 10% (LAEMMLI, 1970) em aparato de gel miniatura Bio-Rad (Mini-Protean, BioRad Laboratories). A eletro-transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina, 10% metanol, 0,05% de SDS) durante 120 minutos a amperagem constante de 0,35 A em aparato de transferência miniatura Bio-Rad (MiniProtean) de acordo com

Towbin et al. (1979). Após a transferência, as membranas foram submetidas a etapa de bloqueio (tampão de bloqueio: 10% de leite desnatado, 10 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20) por 1 hora, sob agitação constante em temperatura ambiente; e em seguida incubadas a 4°C *overnight* com anticorpos primários específicos: anti-AKT (1:500), anti-p-[Ser-473]-AKT (1:500), anti-caspase-3 (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Anti-GAPDH (1:1000) (Cusabio Biotech CO, Wunhan, CH) foi usado como controle interno. Após o tempo de incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) durante 1 hora à temperatura ambiente, e então as membranas foram lavadas e incubadas por 5 minutos com substrato quimioluminescente (5 mM de luminol, 4 mM de ácido p-iodofenilborônico, 8 mM de peróxido de hidrogênio, Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8), como descrito em Haan e Behrmann (2007), com modificações. O sinal quimioluminescente foi detectado pelo equipamento C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando o programa LI-COR Image Studio 4.0.

3.5. Ensaios *in vivo*

3.5.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman), machos com 4 semanas de idade e peso com média de 65 g, provenientes do Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em um ambiente com temperatura controlada (21±1 °C), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12 escuro), alimentados com água e ração *ad libitum*.

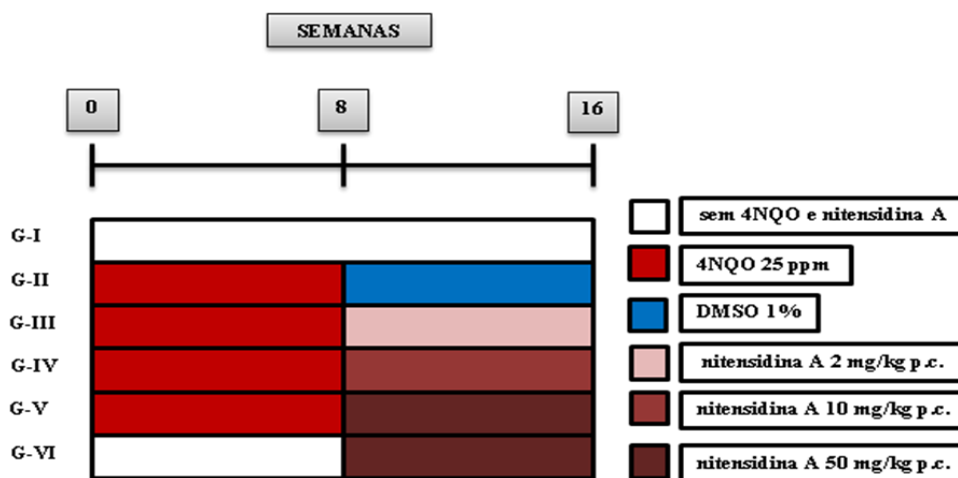
O protocolo experimental foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal local e realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), parecer 02/2015.

3.5.2. Indução da Carcinogênese

Os animais foram submetidos à indução de carcinogênese química com o Óxido de 4-Nitroquinolina – 4NQO (Sigma, USA), após uma semana de adaptação na concentração de 25 ppm, administrado por via oral, na água de beber, durante 8 semanas.

Os animais foram divididos randomicamente em 6 grupos (n=8), como demonstrado na figura 9. O grupo denominado G.I. (controle normal) não foi exposto ao carcinógeno 4NQO e nem foi tratado com o composto nitensidina A. O grupo G.II. (controle positivo) foi exposto ao 4NQO durante 8 semanas e tratado apenas com DMSO 1% por 8 semanas. O grupo G.III. (tratamento) foi exposto ao 4NQO durante 8 semanas, e tratado com nitensidina A (concentração 2 mg/kg p.c.) durante 8 semanas após a administração de 4NQO. O grupo G.IV. (tratamento) foi exposto ao 4NQO durante 8 semanas e tratado com nitensidina A (concentração 10 mg/kg p.c.) durante 8 semanas após a administração de 4NQO. O grupo G.V. (tratamento) foi exposto ao 4NQO durante 8 semanas e tratado com nitensidina A (concentração 50 mg/kg p.c.) durante 8 semanas após a administração de 4NQO. O grupo G.VI. (controle nitensidina A) foi tratado apenas com o alcaloide guanidínico nitensidina A (concentração 50 mg/kg p.c.) durante 8 semanas. A média de peso corporal dos animais no início do tratamento foi em torno de 75g.

Figura 9: Divisão dos grupos na indução da carcinogênese.



Legenda: Grupos de estudo: GI – Grupo Controle Normal; GII – Grupo Controle Positivo; GIII – Grupo Tratado com nitensidina A na dose 2 mg/kg p.c.; GIV – Grupo Tratado com nitensidina A na dose 10 mg/kg p.c.; GV – Grupo Tratado com nitensidina A na dose 50 mg/kg p.c. e GVI – Grupo Controle nitensidina A (50 mg/kg p.c.).

3.5.3. Análise Histopatológica

Após o sacrifício, as línguas dos animais foram removidas e dissecadas para realização das análises macroscópicas nos tumores, descrevendo assim alterações clinicamente visíveis, onde foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas para posterior processamento histológico. As lâminas com cortes semi-seriados de 4 µm de espessura foram coradas com H. E. (hematoxilina e eosina) para análise histopatológica.

Os parâmetros histopatológicos das línguas dos animais foram analisados de acordo com o grau de displasia (I e II), tipo de carcinoma (*in situ*, micro-invasivo e invasivo), invasão (muscular, glandular e no tecido adiposo), intensidade de inflamação (leve, moderada e forte), tipo de inflamação (aguda, crônica e mista) (VIZZOTTO JUNIOR, et al 2003; KUJAN, et al 2006; PENG, et al 2015; MCCORMICK, et al 2010) e avaliação do índice mitótico (número de mitoses por dez campos de 400 vezes).

3.5.4. Análises bioquímicas

Durante o desenvolvimento da carcinogênese com 4NQO e tratamento com nitensidina A, foram realizadas coletas de sangue total, para avaliação da glicemia, dos parâmetros de toxicidade hepática (determinação dos níveis séricos das enzimas AST, ALT e ALP) e renal (determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina). O peso corporal dos animais foi acompanhado semanalmente durante todo o período experimental. Após o sacrifício foram removidos fígado, estômago, rim e coração para quantificação dos níveis teciduais de malondialdeído. Ainda, o plasma foi quantificado quanto aos níveis de malondialdeído.

3.5.4.1. Preparo das amostras sanguíneas

O sangue foi coletado da extremidade da cauda dos animais após vasodilatação periférica induzida por calor. Os animais foram deixados em caixas previamente aquecidas por aproximadamente 2 minutos, e a extremidade distal da cauda foi cortada (3 mm). Foi coletado aproximadamente 1mL de sangue total por animal, em microtubos (eppendorf®) com heparina sódica. Após a coleta, o plasma foi separado por

centrifugação a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Para realização do ensaio do cometa, aproximadamente 100 µL de sangue total foi armazenado em gelo até o momento do processamento da amostra.

3.5.4.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos analisados foram a glicemia pelo método da glicose-oxidase (TRINDER, 1969; HALL, 2003), alanina aminotransferase (ALT) pelo método cinético (WRÓBLENSKI & LADUE, 1956), aspartato aminotransferase (AST) pelo método cinético (BERGMEYER et al. 1977), fosfatase Alcalina (ALP) pelo método colorimétrico (SCANDINAVIAN, 1974), ureia pelo método colorimétrico (BERGMEYER, 1977; BOLLET, 1961) e creatinina pelo método colorimétrico (COOK, 1971).

3.5.4.3. Determinação dos níveis de malondialdeído nos tecidos gástrico, hepático e plasmático

Foram determinados por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) com o malondialdeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados presentes na amostra (OZTURK et al., 2009).

O plasma e o sobrenadante do homogenato dos órgãos coletados (fígado, estômago, rim e coração) foram submetidos a um processo de desproteinização descrito segundo Pilz et al. (2000). O MDA foi determinado espectrofotometricamente (órgãos) e fluorimetricamente (plasma) a partir de uma curva-padrão, segundo a metodologia descrita por Kohn; Liversedge (1944).

3.5.5. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa

O teste do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh et al. (1988). Lâminas limpas foram mergulhadas horizontalmente em agarose com ponto de fusão normal à 60 °C aproximadamente, e em seguida foram secas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização. Para a realização do teste do cometa,

primeiramente foi preparada uma solução de lise que ficou sob refrigeração 2 h antes do uso ou até que atingisse 4 °C, depois, a agarose de baixo ponto de fusão foi diluída em solução de PBS 1X e, posteriormente foi transferida para um banho-maria a 37 °C e os seguintes procedimentos foram executados sem a incidência direta de luz branca.

Para a realização do ensaio cometa, foram retirados 20 µL de sangue e transferido para microtubos, onde foi adicionado 200 µL de agarose (*Low melting point* - Sigma) e realizada a homogeneização. A seguir, essa mistura foi distribuída sobre as lâminas previamente preparada com agarose com ponto de fusão normal e cobrimos lentamente com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas na geladeira por 15 minutos e, após esse procedimento, a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina foi mergulhada, em solução de lise, *overnight*, sob refrigeração ao abrigo da luz.

Em seguida a eletroforese foi realizada com a cuba de eletroforese envolvida num banho de gelo, mantendo-a a 4 °C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese, sendo demarcado o lado da lâmina que foi deixado para o pólo negativo, a fim de que os cometas (fragmentos de DNA) não fossem perdidos na solução-tampão durante o desenvolvimento eletroforético. Os eventuais espaços excedentes na cuba foram preenchidos por lâminas limpas, a solução tampão de eletroforese (4 °C) foi colocada na cuba de eletroforese até cobrir as lâminas e estas foram deixadas durante 20 minutos em repouso para que houvesse o relaxamento das moléculas de DNA. Em seguida, a fonte de eletroforese foi regulada para 25 V, bem como, a 300 mA e potência, sendo as lâminas submetidas ao desenvolvimento eletroforético por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas com solução de neutralização por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto para fixação e secadas a temperatura ambiente.

Para coloração das lâminas, foram utilizados 20 µL de solução de brometo de etídio por lâmina e, posteriormente, a lâmina foi coberta com lamínula (24 x 60 mm). A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes. Esse aumento permitiu a observação de imagens microscópicas com contorno circular (sem danos no DNA) ou núcleo celular fragmentado em forma de “cometa” (com danos no DNA).

Para a realização do ensaio cometa, foram capturadas imagens de 100 nucleóides por alíquota de sangue da cauda dos camundongos e posteriormente analisadas pelo software TriTek *CometScore*TM versão 1.5. Esse software fornece os seguintes dados: tamanho dos fragmentos do nucleóide (FN) sob a forma de cometa, média da fragmentação do cometa, área da cabeça do cometa, FN da cabeça do cometa, média da FN da cabeça no cometa, porcentagem de DNA na cabeça, FN da cauda, média da FN da cauda, porcentagem de DNA na cauda, tamanho da cauda, *Tail Moment* (TM) e *Olive Moment*. A análise do TM nos permite relacionar a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese. (MOLLER, 2005).

3.6. Análise Estatística

Para comparação dos ensaios *in vitro* de citotoxicidade, avaliação do tipo de morte celular (anexina V, exclusão por fluorocromos, TUNEL, caspase-3), micronúcleo, TBARS foi aplicado o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) seguido pelo pós teste de Tukey e para o ensaio de *Western blot* foi utilizado *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prisma Version 6.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos testes estatísticos foi considerado o nível de $p < 0,05$ (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$).

Para as análises macroscópicas, microscópicas e parâmetros bioquímicos dos ensaios *in vivo*, foi aplicado o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) seguido pelo pós teste de Tukey. As análises referentes a intensidade e tipo de inflamação, ainda as análises histológicas (acantose, hiperqueratose e reação liquenóide) foi realizada o teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para o ensaio do cometa foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós test de Dunn's. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prisma Version 6.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos testes estatísticos foi considerado o nível de $p \leq 0,05$ (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$).

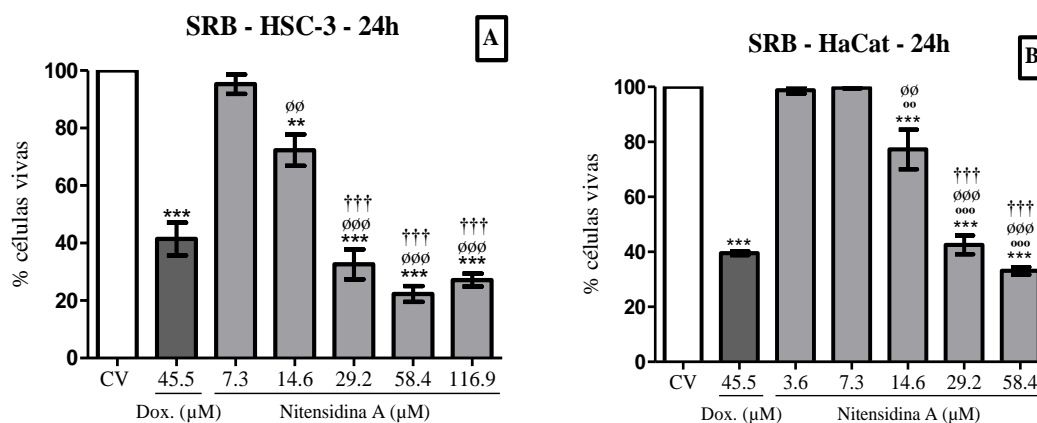
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade da nitensidina A (figura 10) foi avaliada nas concentrações de 7,3; 14,6; 29,2; 58,4 e 116,9 μM , solubilizadas em DMSO 1% na linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 e na linhagem de queratinócito humano – HaCat, nas concentrações 3,6; 7,3; 14,6; 29,2; 58,4 μM , em 24 horas de tratamento.

Figura 10: Ensaio de citotoxicidade (SRB)



Legenda: A) Comparação entre a concentração de nitensidina A e porcentagem de células HSC-3 vivas; B) Comparação entre a concentração de nitensidina A e porcentagem de células HaCat vivas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$) analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). CP: controle positivo, doxorubicina 45.5 μM ; CV: controle de veículo (DMSO 1 %); comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 3,6 μM de nitensidina A; † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$; ††† $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μM de nitensidina A; ††† $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μM de nitensidina A.

Foi possível observar aumento da citotoxicidade proporcional ao aumento da concentração na linhagem HSC-3, na qual, a maior concentração proporcionou menor porcentagem de células vivas, ou seja, maior taxa de morte celular. Contudo, na menor concentração (7,3 μM) a porcentagem de morte celular não foi evidenciada, demonstrando baixa citotoxicidade do composto nitensidina A. Notamos que houve diferença estatística significativa em todas as concentrações que demonstraram

citotoxicidade (14,6; 29,2; 58,4 e 116,9 μM), em comparação ao controle de veículo. Observamos ainda que houve diferença estatística entre as concentrações avaliadas.

Na linhagem HaCat foi possível observar aumento da citotoxicidade proporcional ao aumento da concentração (efeito concentração-resposta), na qual, a maior concentração promoveu menor porcentagem de células vivas, ou seja, maior taxa de morte celular. Nas menores concentrações (3,6 e 7,3 μM) a porcentagem de morte celular não foi observada. As três concentrações citotóxicas (14,6; 29,2 e 58,4 μM), apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao controle de veículo, e entre si.

A determinação do CI_{50} (concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular) foi calculada por meio do Software GraphPad Prism, onde obtivemos os valores de 25,6 μM e 30,3 μM , para SiHa e HaCat, respectivamente.

A constante busca por novos agentes extraídos de fontes naturais contra os diversos tipos de câncer vem sendo cada vez mais estudada, uma vez que as plantas tem sido uma fonte rica de agentes terapêuticos, servindo de base para a síntese de fármacos e tornando-se importante no estudo e desenvolvimento de novos medicamentos, com o intuito de promover a morte das células tumorais e controlar os efeitos colaterais severos e intensos causados durante esse processo (BLAGOSKLONNY, 2005; BLAGOSKLONNY, 2006). Dessa maneira, a flora brasileira por apresentar uma alta diversidade, desempenha um papel importante na descoberta de compostos naturais com efeito antitumoral (MANN, 2002; NEIDLE et al. 2005).

Apesar dos avanços alcançados na pesquisa e em terapias, muitos tumores ainda apresentam mal prognóstico, dessa maneira, o câncer é considerado um crescente problema de saúde pública mundial, com altos índices de morbidade e mortalidade (LIU e WANG, 2015).

Em nosso trabalho estudamos o câncer bucal, que apresenta alto índice de prevalência de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estima-se que para o ano 2016 haverá 15.490 novos casos, sendo 11.140 homens e 4.350 mulheres. Nesse sentido, buscamos através do alcaloide guanidínico nitensidina A um efeito promissor contra esse tipo de doença.

O tratamento com nitensidina A apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações testadas, tanto na linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 como na linhagem de queratinócito humano – HaCat.

Os alcalóides derivados de plantas são compostos que podem impedir a divisão celular, evitando a formação de células novas, atuando como agentes antimicóticos tais como: colchicina e alcalóides da Vinca. A capacidade dos alcalóides em destruir as células tumorais vem sendo amplamente investigada, demonstrando ser fonte promissora para o desenvolvimento de novos fármacos (LI et al. 2008).

Os estudos de citotoxicidade com a *Garcinia malaccensis*, rica em flavonóides, compostos fenólicos e também xantonas, utilizando o ensaio de MTT por 24 horas de tratamento, demonstraram o potencial citotóxico de isolados de α -Mangostin (fruta da *Garcinia*) contra as células cancerígenas HSC-3 e K562 (leucemia mielóide crônica), inibindo assim, a proliferação celular e com valores de CI50 de 0,33 e 0,40 μ M, respectivamente (TAHER et al. 2012). Shimizu e colaboradores (2016) também demonstraram citotoxicidade para a linhagem HSC-3 através do ensaio de MTT, tratadas com Agarol, um produto natural extraído do cogumelo *Agaricus Blazei*, assim como a nitensidina A, que demonstrou um claro efeito citotóxico para a linhagem HSC-3.

No estudo de Chu e colaboradores (2009), foi demonstrado o efeito de Gefitinib (usado o tratamento de cancro de pulmão – inibidor da tirosina quinase) sozinho e associado ao Docetaxel (utilizado no tratamento de cancer de mama e pulmão, por exemplo), onde o Gefitinib foi mais efetivo contra 5 linhagens de tumores humanos, dentre elas a linhagem HSC-3, do que em linhagens orais normais humanas como fibroblastos da polpa gengival, através do ensaio de MTT em 24 horas de tratamento, corroborando assim com nosso trabalho, pois mesmo não demonstrando baixa citotoxicidade para a linhagem controle HaCat, o composto nitensidina A apresentou também um potencial citotóxico contra a linhagem de câncer de boca HSC-3, iniciando dessa maneira estudos mais aprofundados com esse possível antitumoral.

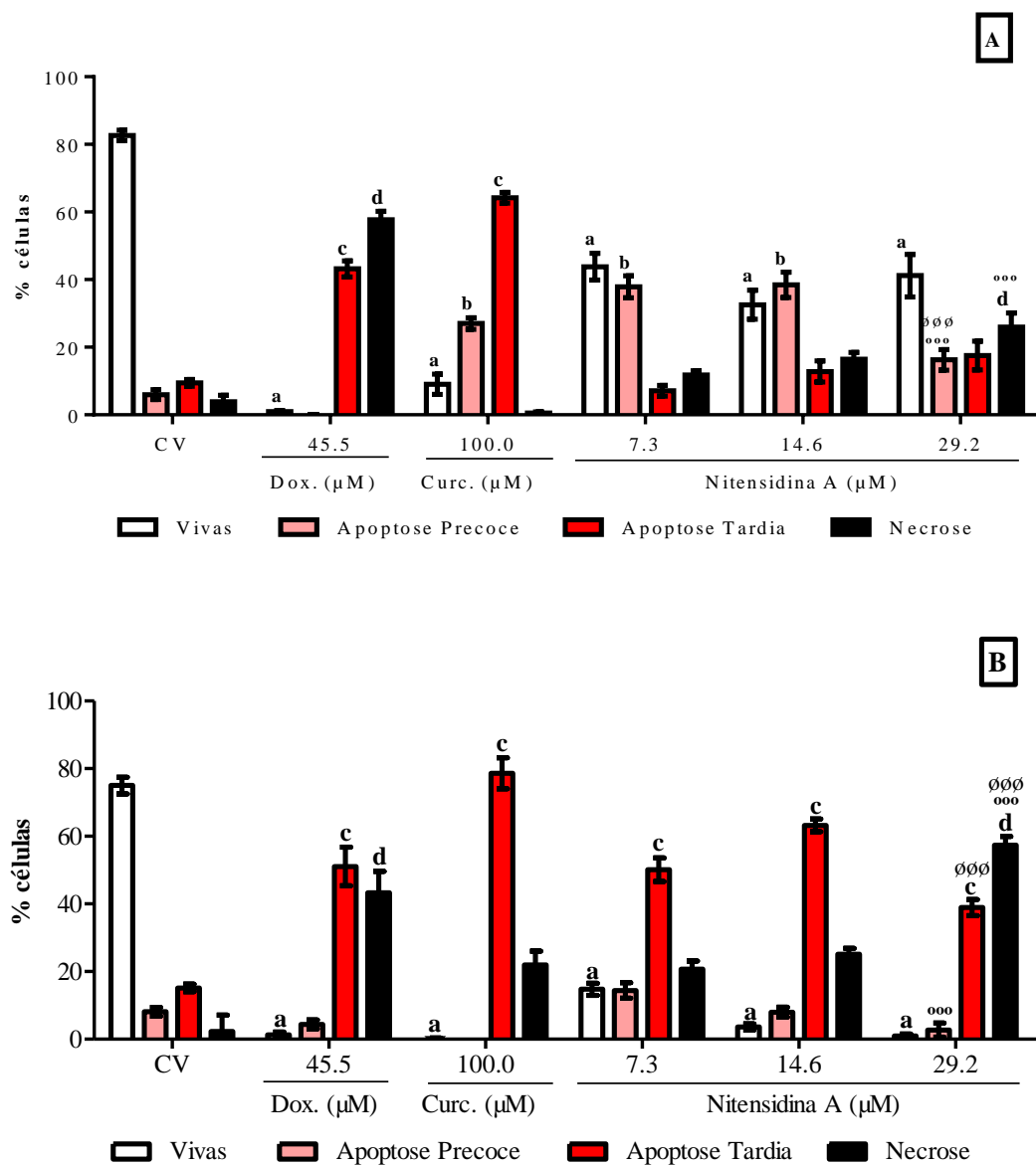
4.1.2. Ensaio de Morte Celular

4.1.2.1. Anexina V

O ensaio de Anexina V foi realizado com o intuito de avaliar o efeito indutor de apoptose, nas linhagens HSC-3 e HaCat tratadas nas concentrações 7,3; 14,6 e 29,2 μ M de nitensidina A. Doxorrubicina (45,5 μ M) e curcumina (100,0 μ M) foram utilizadas

como controle positivo, e como controle de veículo foi utilizado DMSO 1%. A figura 8 demonstra o ensaio de Anexina V na linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 tratadas por 12h (figura 11A) e 24h (figura 11B).

Figura 11: Ensaio de Anexina V na linhagem HSC-3



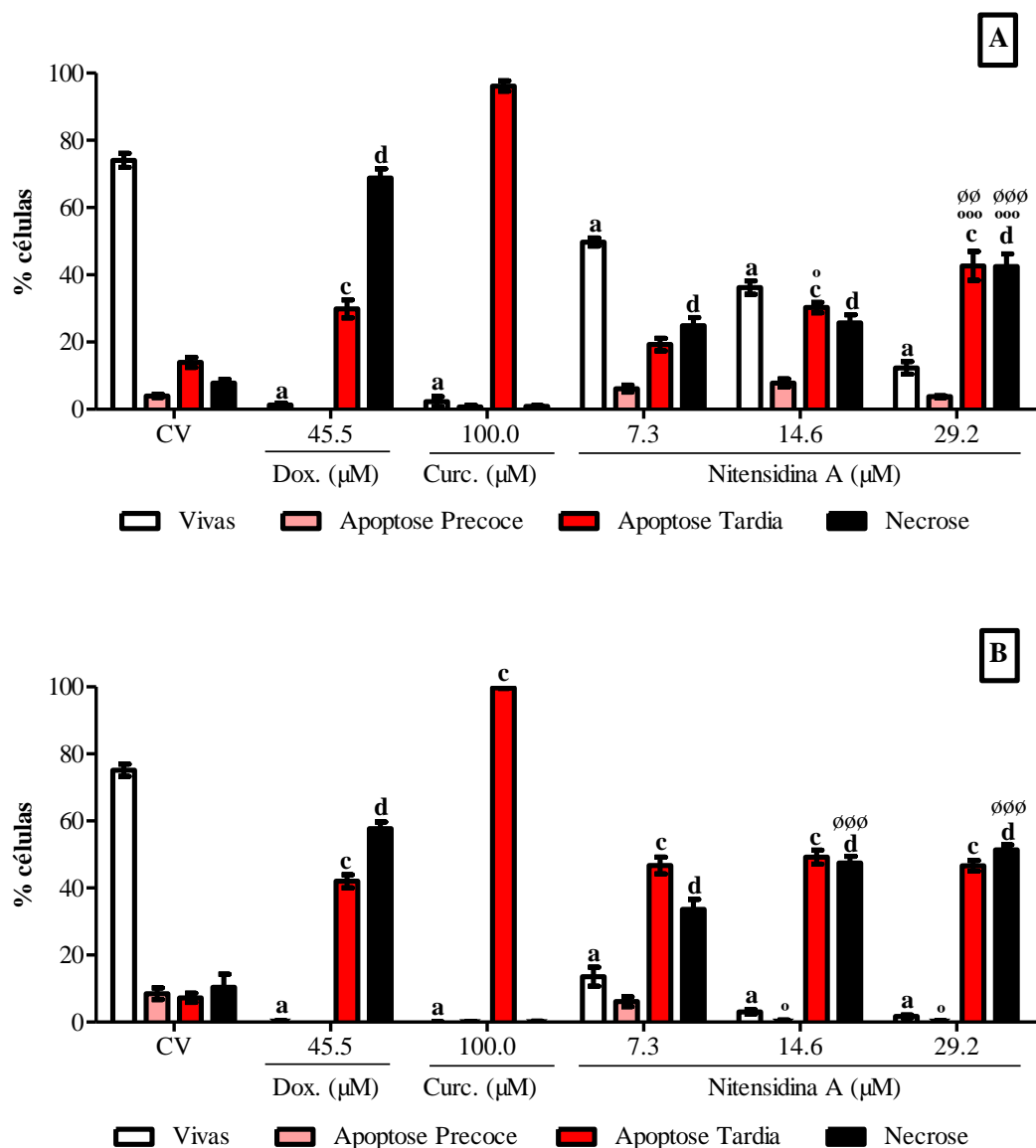
Legenda: Ensaio de apoptose pelo teste de anexina V em células HSC-3 após tratamento com nitensidina A por 12 h (A) e 24 h (B). Relação entre apoptose precoce, tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). Dox: doxorubicina 45,5 μ M; Curc: curcumina 100 μ M; CV: controle de veículo: DMSO 1 %; a= células vivas $p \leq 0,05$; b= células em apoptose precoce $p \leq 0,05$; c= células em apoptose tardia $p \leq 0,05$ e d= células em necrose $p \leq 0,05$; comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μ M de nitensidina A; ø $p \leq 0,05$; øø $p \leq 0,01$; øøø $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μ M de nitensidina A.

No ensaio de Anexina V, a linhagem HSC-3 tratada por 12 h com nitensidina A, demonstrou que as concentrações 7,3 e 14,6 μM , apresentaram valores $37,8\pm 3,2\%$ e $38,4\pm 3,7\%$ respectivamente de morte por apoptose precoce apresentando diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle de veículo, e que a maior concentração apresentou perfil de morte celular mista (apoptose precoce, tardia e necrose). A maior concentração de nitensidina A demonstrou ainda diferença estatística significativa quando comparada com as duas menores concentrações testadas por apoptose precoce, e também por necrose (7,3 μM vs 29,2 μM).

No tratamento por 24 horas notamos efeito concentração resposta de morte por apoptose tardia nas concentrações de 7,3 e 14,6 μM , sendo que a maior concentração testada demonstrou taxa elevada de morte por apoptose tardia e necrose ($38,9\pm 2,3\%$ e $57,4\pm 2,5\%$ respectivamente). A maior concentração de nitensidina A apresentou diferença estatística significativa de morte por apoptose tardia e necrose quando comparadas ao controle de veículo, e demonstrou ainda diferença estatística entre as concentrações (apoptose precoce 7,3 μM vs 29,2 μM ; apoptose tardia 14,6 μM vs 29,2 μM e necrose 7,3 μM vs 29,2 μM ; 14,6 μM vs 29,2 μM).

A figura 12 demonstra o ensaio de Anexina V para a linhagem de queratinócito humano – HaCat, tratadas por 12 (figura 12A) e 24 horas (figura 12B) com nitensidina A.

Figura 12: Ensaio de Anexina V na linhagem HaCat



Legenda: Ensaio de apoptose pelo teste de anexina V em células HaCat após tratamento com nitensidina A por 12 h (A) e 24 h (B). Relação entre apoptose precoce, tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). Dox: doxorubicina 45,5 μ M; Curc: curcumina 100 μ M; CV: controle de veículo: DMSO 1 %; a= células vivas $p \leq 0,05$; b= células em apoptose precoce $p \leq 0,05$; c= células em apoptose tardia $p \leq 0,05$ e d= células em necrose $p \leq 0,05$; comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μ M de nitensidina A; ø $p \leq 0,05$; øø $p \leq 0,01$; øøø $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μ M de nitensidina A.

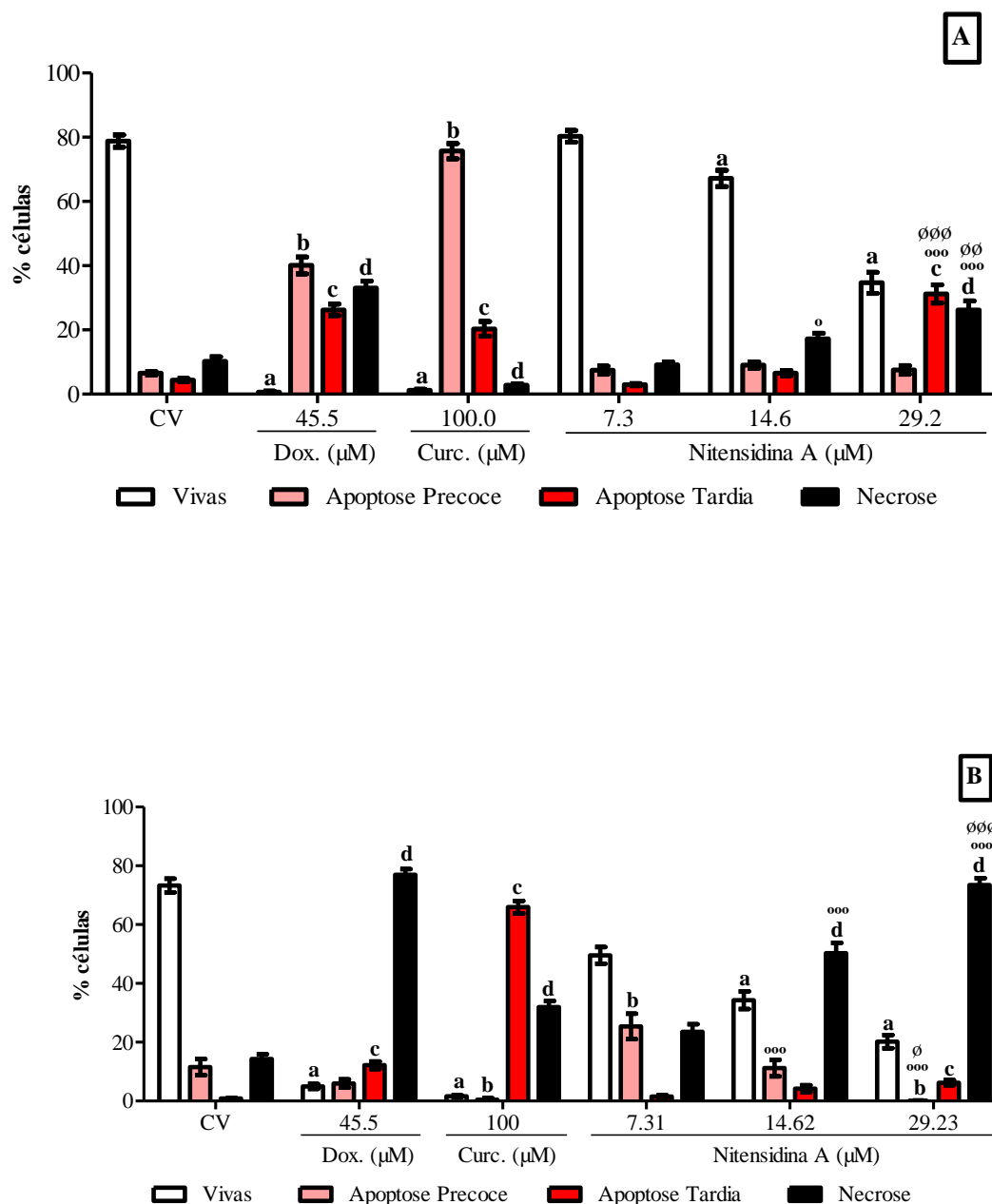
Para a linhagem HaCat, podemos observar perfil de morte mista nas três concentrações testadas, preferencialmente por apoptose tardia e necrose em 12 e 24 horas de tratamento com nitensidina A, apresentando diferença estatística significativa quando comparadas ao controle de veículo, e observamos ainda diferença entre as concentrações testadas (12 horas de tratamento: apoptose tardia 7,3 μ M vs 14,6 μ M; 7,3

μM vs 29,2 μM ; 14,6 μM vs 29,2 μM e necrose 7,3 μM vs 29,2 μM ; 14,6 μM vs 29,2 μM ; 24 horas de tratamento: necrose 7,3 μM vs 14,6 μM e 7,3 μM vs 29,2 μM);).

4.1.2.2. Ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos

O ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos (HO/IP) foi realizado com o intuito de demonstrar os tipos de morte celular (apoptose e necrose) nas linhagens. A Figura 10 demonstra o ensaio de exclusão por fluorocromos na linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 tratadas por 12h (figura 13A) e 24h (figura 13B) com nitensidina A.

Figura 13: Ensaio de citomorfológico de exclusão por fluorocromos - HSC-3

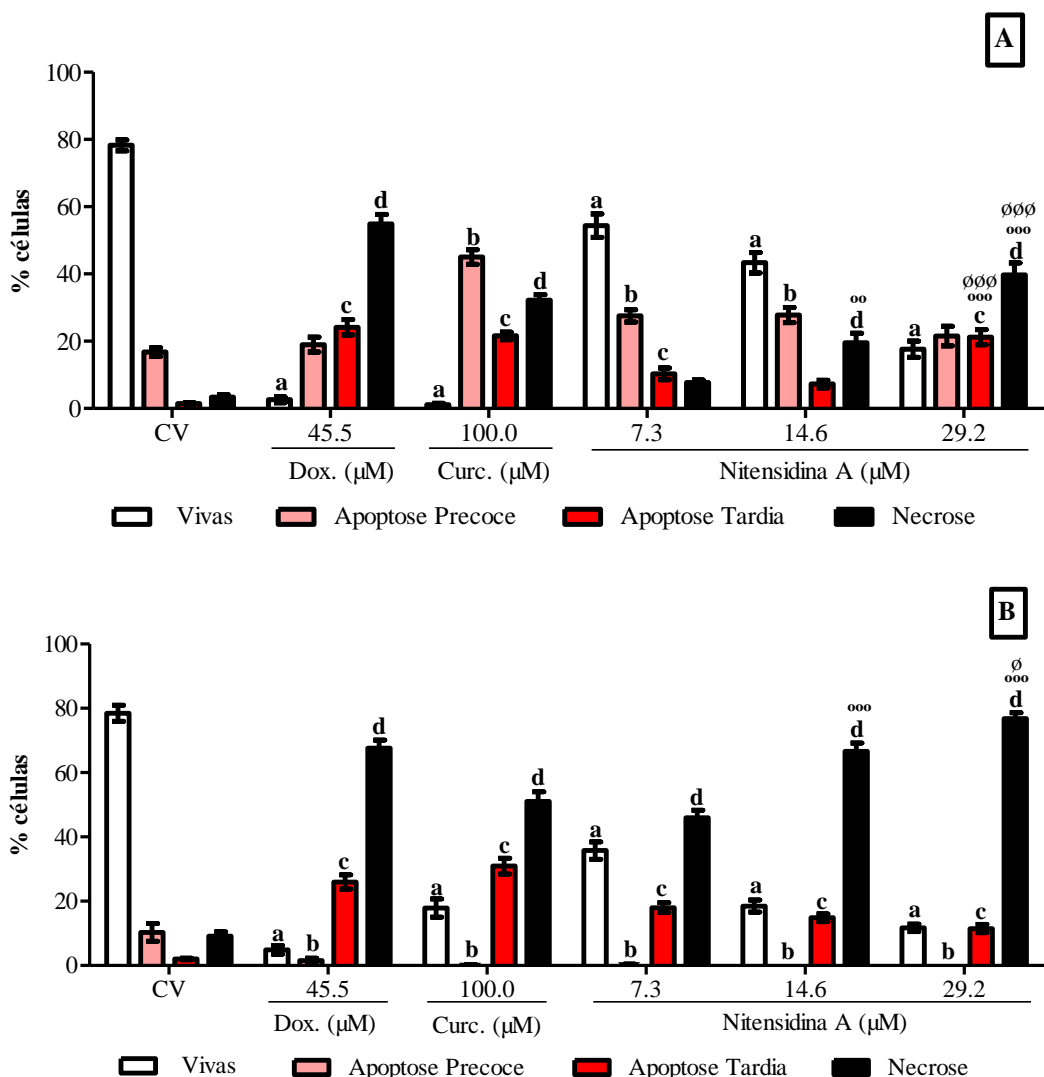


Legenda: Ensaio de apoptose pelo teste citomorfológico de exclusão por fluorocromos em células HSC-3 após tratamento com nitensidina A por 12 h (A) e 24 h (B). Relação entre apoptose precoce, tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). Dox: doxorubicina 45,5 μM ; Curc: curcumina 100 μM ; CV: controle de veículo: DMSO 1 %; a= células vivas $p \leq 0,05$; b= células em apoptose precoce $p \leq 0,05$; c= células em apoptose tardia $p \leq 0,05$ e d= células em necrose $p \leq 0,05$; comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μM de nitensidina A; ø $p \leq 0,05$; øø $p \leq 0,01$; øøø $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μM de nitensidina A.

Para a linhagem HSC-3 em 12 horas de tratamento, notamos que houve porcentagem baixa de morte celular nas menores concentrações tratadas com o alcaloide nitensidina A, e que a concentração de 29,2 μM apresentou perfil de morte mista preferencialmente por apoptose tardia e necrose, demonstrando diferença estatística significativa entre as concentrações e quando comparadas ao controle de veículo.

Já em 24 horas de tratamento, para a concentração de 7,3 μM obtivemos morte por apoptose precoce ($25,3 \pm 4,3\%$) e necrose ($23,5 \pm 2,5\%$), e as maiores concentrações demonstraram número elevado de morte por necrose com efeito concentração resposta e diferença estatística significativa entre as concentrações (7,3 μM vs 14,6 μM ; 7,3 μM vs 29,2 μM e 14,6 μM vs 29,2 μM) e ainda comparadas ao controle de veículo.

O ensaio de exclusão por fluorocromos para a linhagem HaCat está demonstrado na figura 14 tratadas por 12h (Figura 14A) e 24h (Figura 14B) com nitensidina A.

Figura 14: Ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos - HaCat

Legenda: Ensaio de apoptose pelo teste citomorfológico de exclusão por fluorocromos em células HaCat após tratamento com nitensidina A por 12 h (A) e 24 h (B). Relação entre apoptose precoce, tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão (M \pm EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). Dox: doxorubicina 45,5 μ M; Curc: curcumina 100 μ M; CV: controle de veículo: DMSO 1 %; a= células vivas $p \leq 0,05$; b= células em apoptose precoce $p \leq 0,05$; c= células em apoptose tardia $p \leq 0,05$ e d= células em necrose $p \leq 0,05$; comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μ M de nitensidina A; ø $p \leq 0,05$; øø $p \leq 0,01$; øøø $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μ M de nitensidina A.

Para a linhagem HaCat, em 12 horas de tratamento, notamos que na concentração de 7,3 μ M tivemos 27,52 \pm 1,8% de morte por apoptose precoce, a concentração de 14,6 μ M demonstrou morte por apoptose precoce (27,7 \pm 2,5%) e necrose (19,5 \pm 2,8%), sendo que a maior concentração testada do alcaloide demonstrou perfil de morte mista, com número elevado de morte por necrose, demonstrando diferença estatística significativa em comparação ao controle de veículo e entre as concentrações testadas (7,3 μ M vs 14,6 μ M; 7,3 μ M vs 29,2 μ M e 14,6 μ M vs 29,2 μ M).

Em 24 horas de tratamento, as três concentrações testadas do alcaloide demonstraram morte preferencialmente por necrose, com claro efeito concentração-resposta e diferença estatística significativa entre as concentrações (7,3 μM vs 14,6 μM ; 7,3 μM vs 29,2 μM e 14,6 μM vs 29,2 μM) e em comparação ao controle de veículo.

As tabelas demonstradas abaixo (2 e 3), representam a média dos ensaios de Anexina V e Ensaio citomorfológico de exclusão de fluorocromos nas linhagens HSC-3 e HaCat. Demonstrando o total de células apoptose (apoptose precoce e apoptose tardia) *versus* necrose.

Tabela 2: Anexina V nas linhagens HSC-3 e HaCat

	HSC-3				HaCat			
	12 h		24 h		12 h		24 h	
	Apoptose	N.	Apoptose	N.	Apoptose	N.	Apoptose	N.
CV	15,4	3,9	23,2	2,3	17,9	7,8	15,7	10,4
45,5 (dox.)	43,2	57,7	55,5	43,3	29,9	68,8	42,0	57,7
100 (curc.)	91,2	0,5	78,7	22,0	96,9	0,9	99,8	0,1
nit A - 7,3	45,0	11,8	64,5	20,7	25,4	24,8	52,8	33,6
nit A - 14,6	51,3	16,4	71,2	25,1	38,1	25,7	49,5	47,4
nit A - 29,2	33,8	25,9	41,6	57,4	46,4	42,5	46,9	51,4

Legenda: Média do número de células mortas por apoptose e necrose (N.), nas linhagens HSC-3 e HaCat tratadas por 12 e 24 horas com nitensidina A (μM). CP = Doxorrubicina (dox. μM) e Curcumina (curc. μM).

Resumidamente, para o ensaio de anexina V, notamos que a linhagem HSC-3 em 12 horas de tratamento com o alcalóide guanidínico nitensidina A, demonstrou morte mista (apoptose e necrose), porém maior número de morte por apoptose. Em 24 horas de tratamento, notamos morte mista com número maior de apoptose nas menores concentrações e de necrose ($57,4 \pm 2,5\%$) na maior concentração (29,2 $\mu\text{g/mL}$). Já para a linhagem HaCat notamos que os dois tempos de tratamento demonstraram perfil de morte mista, concentração resposta.

Tabela 3: Ensaio citomorfológico de exclusão de fluorocromos nas linhagens HSC-3 e HaCat

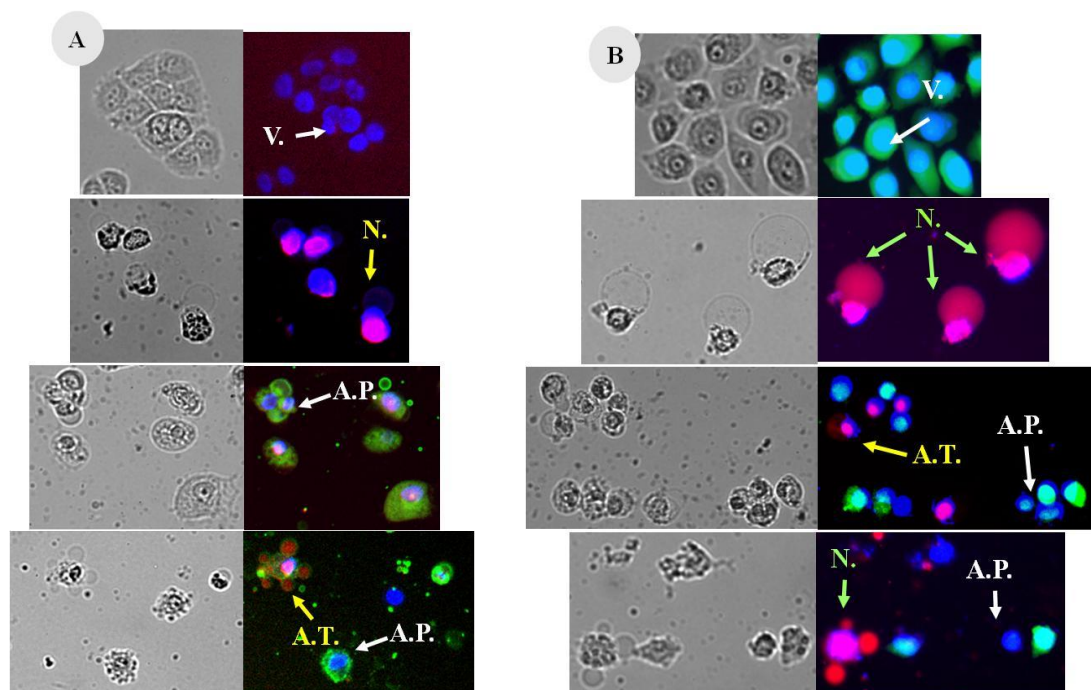
	HSC-3				HaCat			
	12 h		24 h		12 h		24 h	
	Apoptose	N.	Apoptose	N.	Apoptose	N.	Apoptose	N.
CV	10,9	10,2	12,4	14,3	18,2	3,4	12,4	9,2
45,5 (dox.)	66,4	33,0	18,1	76,9	43,1	54,9	27,5	67,6
100 (curc.)	96,0	2,8	66,4	32,0	66,7	32,2	31,1	51,1
nit A - 7,3	10,4	9,2	26,9	23,5	37,8	7,7	18,3	46,0
nit A - 14,6	15,6	17,2	15,4	50,3	35,0	19,5	14,9	66,7
nit A - 29,2	38,8	26,2	6,3	73,5	42,7	39,7	11,5	76,8

Legenda: Média do número de células mortas por apoptose e necrose (N.), nas linhagens HSC-3 e HaCat tratadas por 12 e 24 horas com nitensidina A (μM). CP = Doxorrubicina (dox. μM) e Curcumina (curc. μM).

Para o ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos, resumidamente, observamos que a linhagem HSC-3 em 12 horas de tratamento com nitensidina A, demonstrou morte mista concentração resposta, e para 24 horas de tratamento notamos que houve aumento de morte celular (mista) nas três concentrações testadas, com número elevado de morte por necrose nas maiores concentrações ($29,3 \mu\text{M} = 73,4 \pm 2,3\%$). Para a linhagem HaCat também notamos morte mista nos dois tempos de tratamento com predomínio de apoptose em 12 horas e de necrose em 24 horas.

Sendo assim, podemos sugerir que o alcalóide guanidínico nitensidina A demonstrou perfil de morte mista (apoptose precoce, tardia e necrose) para as duas linhagens avaliadas no presente estudo (HSC-3 e HaCat).

A Figura 15 mostra as imagens das células vivas, em apoptose precoce, apoptose tardia e necrose, ilustrando as imagens adquiridas e quantificadas pelo Equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare).

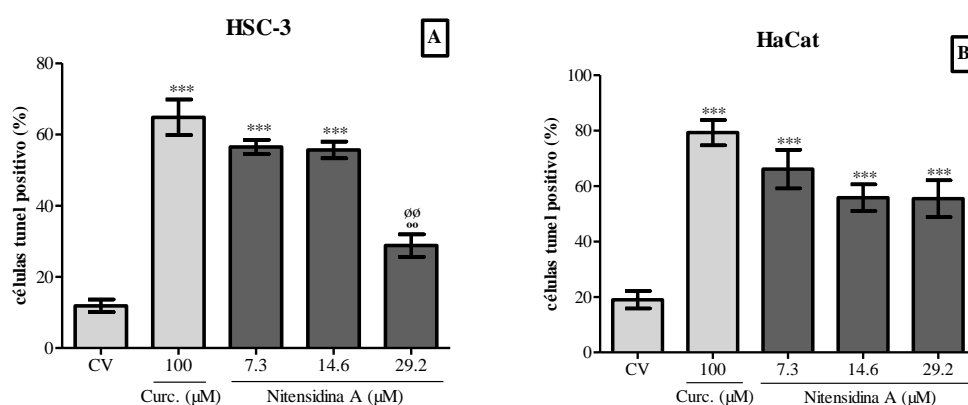
Figura 15: Morfologia das células

Legenda: Imagens adquiridas pelo Equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare) (aumento 200 X). A) Ensaio de Anexina V; B) Ensaio de Hoechst e iodeto de propídeo . V = vivas, AP = apoptose precoce, AT = apoptose tardia e N = necrose.

4.1.2.3. Ensaio do “TUNEL”

O ensaio do TUNEL evidencia a fragmentação internucleossômica de DNA, marcador de apoptose, que é desencadeada por uma enzima conhecida por CAD (“caspase activated DNase”) sendo ativada por caspases e que normalmente existe como um complexo inativo (ICAD). Durante a apoptose o ICAD é clivado por caspases efetoras, liberando a CAD, conduzindo posteriormente à rápida fragmentação do DNA nuclear, diminuição do volume e a fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos (TAYLOR et al. 2008). As células TUNEL positivas apresentam fragmentações no DNA evidenciado pela incorporação de dUTP conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), sendo assim correlacionada com a frequência de células apoptóticas.

A identificação e quantificação de apoptose na linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 e linhagem de queratinócito humano – HaCat estão demonstradas na figura 16, tratadas por 24 horas com nitensidina A.

Figura 16: Ensaio do TUNEL

Legenda: Ensaio de apoptose pelo método do TUNEL após tratamento com nitensidina A na linhagem celular HSC-3 (A) e na linhagem HaCat (B). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados *vs* CV). Curc: controle positivo (CP): curcumina 100 μ M; CV: controle de veículo: DMSO 1 %; comparação entre as concentrações: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ em comparação a 7,3 μ M de nitensidina A; ø $p \leq 0,05$; øø $p \leq 0,01$; øøø $p \leq 0,001$ em comparação a 14,6 μ M de nitensidina A.

Em nosso trabalho, para a linhagem HSC-3 notamos que houve frequência de ativação de apoptose significativa (células TUNEL positivo) nas três concentrações testadas do alcaloide nitensidina A, embora tenha apresentado diferença estatística significativa apenas nas menores concentrações, quando comparadas ao controle de veículo. A maior concentração testada (29,2 μ M) demonstrou porcentagem menor de ativação de apoptose (células TUNEL positivo), o que corrobora com o ensaio da anexina V, onde em 24 horas de tratamento observamos diminuição de apoptose e aumento de necrose. Observamos ainda que houve diferença estatística significativa entre maior concentração, em comparação com as menores concentrações avaliadas.

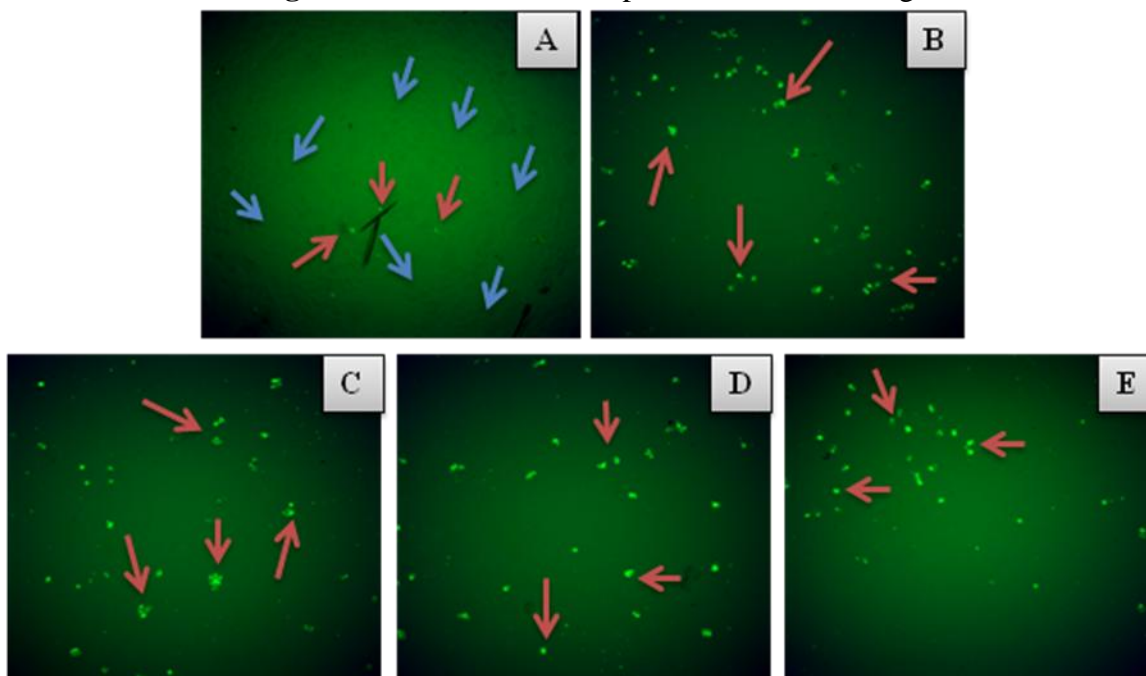
A linhagem HaCat, demonstrou que houve frequência de ativação de apoptose (TUNEL positivo) para as três concentrações testadas, apresentando diferença estatística significativa quando comparadas ao controle de veículo, corroborando assim com o ensaio de anexina V, que demonstrou morte por apoptose tardia nas três concentrações.

O controle positivo utilizado (curcumina 100 μ M) foi efetivo neste ensaio pois apresentou porcentagem de células com fragmentação no DNA de aproximadamente 60 e 80% para as linhagens HSC-3 e HaCat, respectivamente. E o controle de veículo demonstrou ativação de apoptose de cerca de 20% para ambas as linhagens.

A figura 17 mostra as imagens de células TUNEL positivo e TUNEL negativo nos controles e nas células tratadas com nitensidina A. Podemos observar que houve

algumas células marcadas no controle de veículo, e que não há muita diferença entre os tratamentos e o controle positivo.

Figura 17: Células TUNEL positivo e TUNEL negativo



Legenda: Imagens do ensaio do “TUNEL” após tratamento com nitensidina A (24 horas) na linhagem celular HSC-3. A) CV: DMSO 1%; B) CP: curcumina 100 µM; C) Tratamento com nitensidina A na concentração 7,3 µM; D) Tratamento com nitensidina A na concentração 14,6 µM; Tratamento com nitensidina A na concentração 29,2 µM. As seta vermelhas indicam células TUNEL positivo e as setas azuis indicam células TUNEL negativo.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram a atividade de alcalóides guanidínicos, pteroginina e pteroginidina, isolados de *Pterogyne nitens* na indução de apoptose em linhagem de carcinoma epitelial (ZR 7531), esses compostos induziram morte celular programada (DUARTE et al., 2010). No presente estudo foram realizados experimentos para a avaliação de morte celular por apoptose ou necrose na linhagem HSC-3 (carcinoma epidermóide de boca) e HaCat (queratinócito humano). Em ambas as linhagens foi possível observar que houve morte celular por apoptose precoce, tardia e necrose nos dois testes realizados (Anexina V e HO/IP).

O ensaio da anexina V é considerado um teste sensível e essencial para detecção de apoptose, no qual células normais apresentam fosfatidilserina interna enquanto em células em apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina (FS) translocada e ancorada da membrana externa, assim a anexina conjugada ao FITC pode-se ligar facilmente à essa fosfatidilserina (MOCHIZUKI et al. 2003). Dessa maneira, utilizando

o teste de anexina V conjugada com FITC, pode-se avaliar os níveis de FS expostas na membrana externa, indicando a apoptose precoce, e associando o iodeto de propídeo (IP) podemos mensurar células com permeabilidade na membrana, podendo diferenciar uma fase tardia de apoptose da necrose (PEC et al. 2003). Além disso, a fosfatidilserina sinaliza células vizinhas e macrófagos a fagocitarem as células mortas e também bloqueia a inflamação frequentemente associada à fagocitose, inibindo a produção de proteínas sinalizadoras que induzem inflamação (citocinas) por células fagocíticas (ALBERTS, 2010).

Células em necrose ou apoptose tardia exibem os mesmos padrões, pois a anexina V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o iodeto de propídeo entra no citosol, tornando-se difícil a diferenciação dentre os dois estágios de apoptose tardia ou necrose (PEC et al., 2003), porém o método de anexina V pelo equipamento In Cell Analyser nos permite essa diferenciação, a análise é feita através do software, onde as células que apresentam coloração com HO classificam-se em viáveis, células marcadas com anexina-V/FITC e coloração com HO são células em apoptose precoce, as células em apoptose tardia classificam-se pela marcação com anexina-V/FITC e coloração com IP, e por fim, as células em necrose são marcadas com PI. Faz-se ainda necessária a utilização do teste citomorfológico de exclusão de fluorocromos, para complementar o teste da anexina V (HASHIMOTO et al. 2003), assim as alterações que ocorrem nas células durante o estágio de apoptose precoce são claramente definidas, diferenciando os estágios de morte celular (apoptose precoce, tardia e necrose), tornando-se um teste complementar ao ensaio da anexina V (MACIOROWSKI et al. 1998; ELSTEIN & ZUCKER, 1994). O ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos em nosso estudo também foi realizado pelo equipamento In Cell Analyser e analisado pelo software, na qual células viáveis caracterizam-se pela coloração com DAF e HO e apresentam tamanho nuclear normal, as células em apoptose precoce também apresentam coloração com DAF e HO, mas o núcleo é reduzido ou ainda apresentam coloração apenas com HO, células em apoptose tardia são coradas com IP e núcleo reduzido e finalmente células em necrose apresentam coloração com PI e caracterizam-se por mostrar-se com núcleo normal ou aumentado. O software ainda nos permite demarcar um tamanho específico para as células, garantindo assim, e nos permitindo acompanhar, a morfologia das células analisadas.

A resistência à morte por apoptose, em células que não passaram pelo controle do crescimento e da diferenciação normal, indica que é necessária a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer, sendo assim importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer (GRIVICICH et al., 2007).

No presente trabalho, a linhagem HSC-3 em 12 horas de tratamento com o alcaloide guanidínico nitensidina A, demonstrou porcentagem baixa de morte mista, ou seja, morte por apoptose precoce, tardia e necrose nos dois ensaios (Anexina V e HO/IP), já em 24 horas de tratamento esse perfil de morte celular foi diferente, evidenciando taxa maior de morte por apoptose tardia nas menores concentrações e necrose na maior concentração testada, através do ensaio de Anexina V, ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos notamos um claro efeito de concentração resposta por necrose. A relação entre apoptose e câncer vem sendo enfatizada cada vez mais, sugerindo que a progressão da neoplasia envolve alterações dos estágios de apoptose em células normais. Shin e colaboradores (2014) demonstraram que houve indução de apoptose em células de carcinoma epidermóide de boca, revelando ainda o efeito antiproliferativo em dose e tempo dependente do extrato metanol da casca da raiz de *Cudrania tricuspidata*, assim como o composto Mollugin, que é um bioativo fotoquímico isolado de *Rubia cordifolia L.* (Rubiaceae), no qual inibe o crescimento celular demonstrado pelo método do MTT e ainda induz apoptose em células da cavidade oral, caracterizadas pela fragmentação nuclear e pela anexina V conjugada com FITC (LEE et al., 2013).

A progressão das células malignas e a velocidade em que estas células são mortas e eliminadas determinam o crescimento do tumor. Estudos com modelos animais e com linhagens celulares demonstram que há alguma falha na programação da morte de células neoplásicas na maioria dos diferentes tipos de cânceres. Dessa maneira uma estratégia terapêutica ideal seria conseguir inibir o crescimento do tumor e induzir a morte nestas células tumorais. Entretanto, o maior desafio nos tratamentos de câncer é diminuir a citotoxicidade e morte celular de modo seletivo, afetando levemente as células normais com multiplicação controlada, e em nosso estudo a célula controle (normal) utilizada foi a HaCat, no qual notamos um perfil de morte celular semelhante a linhagem HSC-3, pois para o ensaio de Anexina V, nos dois tempos de tratamento notamos morte por apoptose tardia e necrose, embora em 12 horas nas menores

concentrações tivemos uma taxa mais baixa de morte celular. Jang e colaboradores (2016) realizaram um estudo para investigar a toxicidade e o perfil de morte celular que o fungicida trifloxistrobina demonstrava na linhagem HaCat, e notaram morte celular por apoptose, através dos ensaios de Anexina V e TUNEL em 24 e 48 horas de tratamento, corroborando dessa maneira com o ensaio do TUNEL realizado em nosso estudo, pois notamos que houve ativação de apoptose (TUNEL positivo) nas três concentrações testadas do alcaloide nitensidina A. .

No ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos em 12 horas de tratamento com o alcaloide, notamos que houve morte por apoptose precoce nas três concentrações, e que a maior concentração testada evidenciou aproximadamente 40% de morte por necrose, sendo que esse perfil foi comprovado no tempo de tratamento mais longo (24 horas), demonstrando o efeito concentração resposta para a linhagem HaCat.

Os controles utilizados em nosso estudo mostraram-se eficientes, a doxorubicina demonstrou morte preferencialmente por necrose e a curcumina morte por apoptose corroborando assim com a literatura, um estudo com curcumina foi realizado para verificar seu papel como um indutor eficaz de apoptose em células de câncer cervical, este estudo demonstrou por meio do método de coloração por laranja de acridina e brometo de etídio avaliados por microscopia de fluorescência, que a curcumina é capaz de induzir seletivamente a apoptose em células de câncer cervical (DIVYA & PILLAI, 2006), assim como em nosso trabalho com as linhagens HSC-3 e HaCat.

A patogênese de diversas doenças como o câncer, a aterosclerose, infecções, inflamações e também distúrbios neurodegenerativos estão associados com a desregulação dos eventos da morte celular e da regulação do ciclo celular, sendo assim, do ponto de vista clínico, visto que a maquinaria das células consiste de passos geneticamente regulamentados para sua própria destruição e a compreensão de que a maquinaria suicida desta célula é freqüentemente desabilitada em patologias humanas, sugere-se que o processo de morte celular pode ser passível de intervenção terapêutica. A morte celular e o ciclo celular e são dois processos fisiológicos que estão relacionados no controle da homeostase tecidual em organismos adultos. A proliferação celular, a integridade do genoma, e a sobrevivência são reguladas por uma rede intrincada de vias

que incluem os pontos de verificação do ciclo celular, reparo e recombinação do DNA e também a morte celular programada (ZHIVOTOVSKI & ORRENIUS, 2010).

Em nossos estudos utilizamos métodos específicos de morte celular envolvendo apoptose e necrose. Células morrem por apoptose sob modificações celulares características, se encolhendo e condensando, o citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desfaz e a cromatina nuclear se condensa e quebra-se em fragmentos. A superfície celular comumente forma bolhas e se a célula é grande, frequentemente quebra-se em fragmentos envolvidos por membranas, os chamados corpos apoptóticos, dessa maneira a célula morre sem causar uma resposta inflamatória prejudicial, pois fica fácil desses corpos apoptóticos serem fagocitados antes de liberarem seus conteúdos (ALBERTS, 2010). Em contraste, temos a morte celular por necrose, uma morte em resposta a uma injúria aguda, na qual essas células se expandem e “explodem”, liberando todo conteúdo intracelular e causando uma resposta inflamatória (ALBERTS, 2010).

Contudo, com o aparecimento de métodos bioquímicos que permitiram quantificar a expressão, atividade e localização celular de proteínas envolvidas nos processos de morte celular, tornou-se possível a diferenciação dos tipos de morte, pois além de classifica-las através da marcação por anexina V conjugada com FITC e pelos fluoróforos, podemos também classifica-las quanto as suas estruturas evidentes em cada processo.

Dessa maneira, em nosso estudo com o alcaloide guanidínico nitensidina A podemos sugerir, tanto do ponto de vista morfológico como através dos ensaios Anexina V, exclusão por fluorocromos e TUNEL, que para as linhagens HSC-3 e HaCat, tivemos morte celular por apoptose (precoce e tardia) e necrose, o que corrobora com o trabalho de Sorbo (2011) no qual o composto nitensidina A apresentou morte por apoptose (preferencialmente) e necrose nas linhagens de carcinoma cervical humano imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C-33A). Ainda estudos realizados por Souza (2012) evidenciaram que nitensidina B, um análogo da nitensidina A, em linhagem SiHa e C-33A demonstrou morte preferencialmente por apoptose.

4.1.2.4. Avaliação da atividade da caspase-3

A medida da atividade da caspase-3, (caspase efetora ativada na via intrínseca da célula) como um indicador de apoptose foi avaliada utilizando a intensidade de fluorescência por meio da clivagem de um substrato fluorogênico específico para esta enzima. A atuação da enzima sobre o substrato promove a liberação de aminometilcumarina (AMC), que emite fluorescência detectada pelo equipamento. Este ensaio foi realizado para analisar a participação efetiva da caspase-3 na indução de morte celular programada, e constatar morte pela via intrínseca da apoptose. A figura 18 demonstra os resultados da atividade da caspase-3 nas linhagens HSC-3 e HaCat, tratadas por 6 horas.

Figura 18: Ensaio de Caspase-3

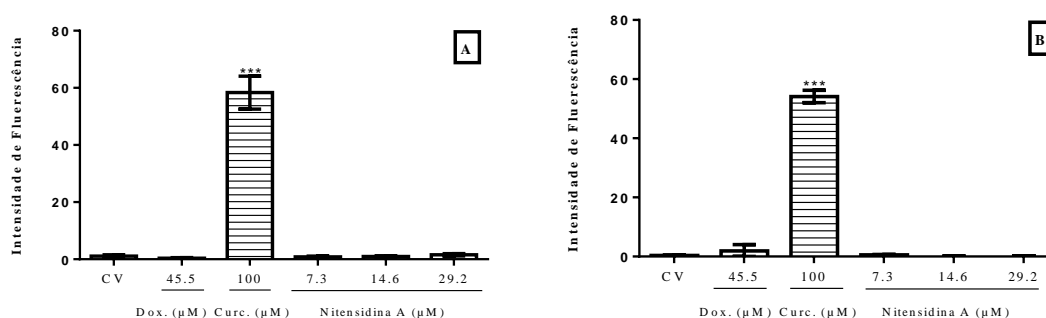


Figura 9: Ensaio de apoptose por ativação da caspase 3. A) Relação entre a intensidade de fluorescência por ativação da caspase 3 nas células HSC-3; B) Relação entre a intensidade de fluorescência por ativação da caspase 3 nas células HaCat. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV).; * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

Para os resultados de ativação da caspase-3 foi observado que para ambas as linhagens HSC-3 e HaCat, não houve ativação da caspase-3 em nenhuma concentração testada pelo composto nitensidina A, sendo assim, podemos sugerir que a morte celular observada nos ensaios anteriores ocorre de maneira independente de caspase-3, e a apoptose demonstrada pelos ensaios realizados (anexina V, Hoechst e iodeto de propídeo e TUNEL) pode ser desencadeada por outras vias bioquímicas de ativação da apoptose (TORRIGLIA et al. 2000; LI et al. 2001; YAMASHIMA, 2000; ALBERTS, 2010).

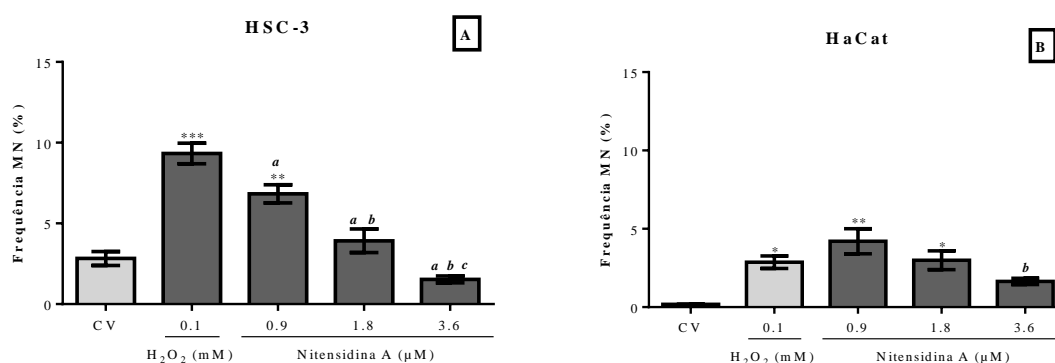
As células tratadas com curcumina demonstraram ativação de caspase-3 com diferença estatística significativa, e as células tratadas com doxorubicina também não

apresentaram aumento na atividade de caspase-3, corroborando com os dados obtidos nos ensaios de morte celular, anexina V e exclusão por fluorocromos, onde observamos morte preferencialmente por necrose.

4.1.3. Avaliação do potencial Mutagênico – Ensaio do Micronúcleo

O ensaio do micronúcleo foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis danos irreparáveis no DNA durante o processo de divisão celular (FENECH, 2000) causados pelo tratamento com o composto nitensidina A. Para o ensaio de micronúcleo utilizamos concentrações não citotóxicas de nitensidina A para tratar (24 horas) as linhagens de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat). A figura 19 demonstra a frequência de micronúcleos encontrado na linhagem HSC-3 e HaCat.

Figura 19: Frequência de Micronúcleos



Legenda: Avaliação do potencial mutagênico sobre as linhagens HSC-3 (A) e HaCat (B). Média±EP do número de micronúcleos encontrados em três experimentos independentes em células tratadas com nitensidina A por 24 horas. CP: peróxido de hidrogênio (0,1mM) e CV: DMSO (1%). Todas as células foram analisadas pelo software IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). (* p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001 em comparação com o controle de veículo; *a* p≤0,05; *aa* p≤0,01; *aaa* p≤0,001 em comparação ao CP ; *b* p≤0,05; *bb* p≤0,01; *bbb* p≤0,001 em comparação a concentração 0,9 μM de nitensidina A; *c* p≤0,05; *cc* p≤0,01; *ccc* p≤0,001 em comparação a concentração 1,8 μM de nitensidina A, analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

No ensaio do micronúcleo podemos sugerir que para a linhagem HSC-3 a menor concentração testada do alcalóide nitensidina A foi mutagênica, assim como o controle positivo ($9,33 \pm 0,63$), demonstrando diferença estatística significativa quando comparadas ao controle de veículo. Quando aumentamos a concentração de nitensidina A notamos que ocorre diminuição de mutagenicidade, apresentando diferença estatística quando comparadas ao controle positivo nas três concentrações testadas. Notamos ainda

que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos quando comparados entre si. A linhagem HaCat demonstrou perfil de mutagenicidade menor do que a linhagem HSC-3, porém houve diferença estatística nas duas menores concentrações testadas (0,9 e 1,8 μM) assim como o controle positivo ($1,198 \pm 0,27$), quando comparadas ao controle de veículo, sugerindo assim, indução de mutagenicidade.

Resultados apresentados por Ferreira et al. (2009), demonstraram que a fração butanólica e hidroalcoólica de *P. nitens* apresentaram ação mutagênica. Estudos demonstraram que outros alcalóides são capazes de induzir aberrações cromossômicas em linhagem celular CHO (chinese hamster ovary) (SASAKI et al., 1992), mutagenicidade em células pulmonares de hamster chinês (CHL) (NAKAYASY et al., 1983); induzem mudanças em cromátides irmãs de linfócitos periféricos humanos (MADLE et al., 1981); e aumentam a frequência de micronúcleo e alterações em cromátides irmãs em células meristemáticas de *Allium cepa* (HAZEN & GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, 1988). A morte celular seja por necrose ou por apoptose, podem evitar a propagação de células danificadas. Entretanto, a presença de células micronucleadas não garante que os danos não sejam propagados para as células filhas.

A frequência de células micronucleadas foi observada por Mohanta et al. (2015) em um estudo clínico com 136 pacientes que sofreram de lesões e pré lesões de câncer na cavidade oral, no qual observaram que essa frequência de células com micronúcleos pode estar aumentada em pacientes de maior idade, concluindo assim que a formação de micronúcleos na mucosa oral pode ser um biomarcador de dano genético e também um indicador potencial da carcinogênese oral. No presente estudo, os dados obtidos demonstraram que nitensidina A foi capaz de induzir mutagenicidade na linhagem de carcinoma epidermóide de boca na concentração 0,9 μM , corroborando assim com os estudos de Mohanta, na qual pode observar frequência de micronúcleos em pacientes com câncer na cavidade oral.

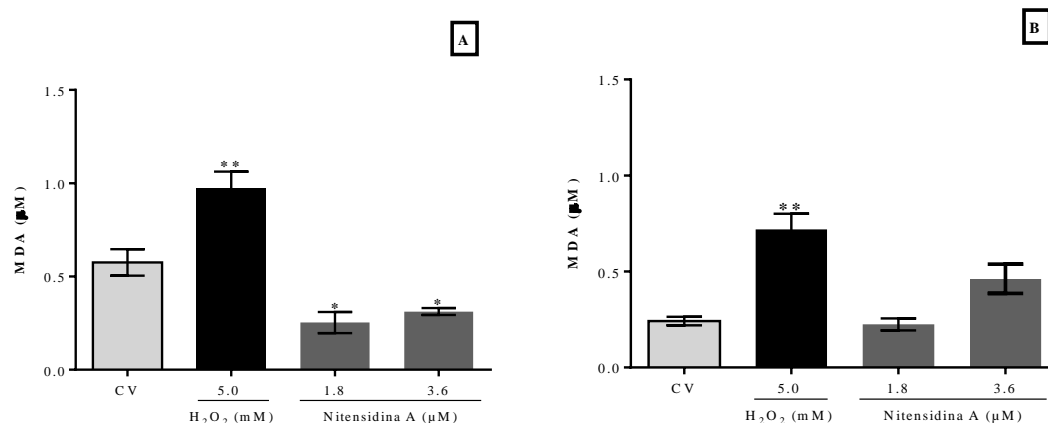
Shashikala e colaboradores (2015) realizaram um estudo de revisão sobre o interesse para citologia oral (como por exemplo através do teste do micronúcleo) como uma metodologia de diagnóstico e prognóstico de câncer, no qual demonstraram que existem biomarcadores que predizem se um distúrbio potencialmente maligno é susceptível de se desenvolver em um tumor agressivo. Estes produtos químicos, genotóxicos e cancerígenos foram referidos como sendo agentes mutagênicos, clastogênicos e potentes, podendo ser responsáveis pela indução de cromátides /

aberrações cromossômicas e resultando na produção de micronúcleos. Vários estudos concluíram que o aumento gradual de micronúcleos (MN) relaciona-se a partir de mucosa oral normal para doenças potencialmente malignas de carcinoma oral, sugerindo uma ligação deste biomarcador com a progressão neoplásica. Nesse sentido então, fez-se de grande importância o teste de micronúcleo que realizamos em nosso trabalho.

4.1.4. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O estresse oxidativo está relacionado com o câncer (REUTER, et al., 2010). Células tumorais estão comumente expostas a condições de estresse, como hipóxia, perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, alterações no metabolismo oxidativo e diversos fatores ambientais (DHILLON, et al., 2007). O estresse oxidativo ocorre quando há perda do equilíbrio entre produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), onde podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, assim como o câncer (SOSA et al., 2013).

Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, expressos em quantidade de MDA formado, foram quantificados para a linhagem de carcinoma epidermóide de boca – HSC-3 e para a linhagem de queratinócito humano - HaCat, tratadas com o alcalóide guanidínico nitensidina A por 24 horas. Os resultados estão expressos na figura 20.

Figura 20: Ensaio de TBARS nas linhagens HSC-3 e HaCaT.

Legenda: Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas linhagens HSC-3 (A) e HaCat (B) após tratamento por 24 horas com nitensidina A. Controle positivo: H₂O₂ (5,0 mM) e controle de veículo DMSO (1%). Resultados estão expressos como média da concentração de MDA (produto formado após a reação do meio extracelular com ácido tiobarbitúrico em meio ácido, a 95°C por 60 minutos) de três experimentos independentes \pm erro padrão (M \pm EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de veículo: * p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001).

O ensaio do TBARS foi realizado para verificar se um dos possíveis mecanismos de ação do composto testado nitensidina A poderia estar relacionado ao estresse oxidativo.

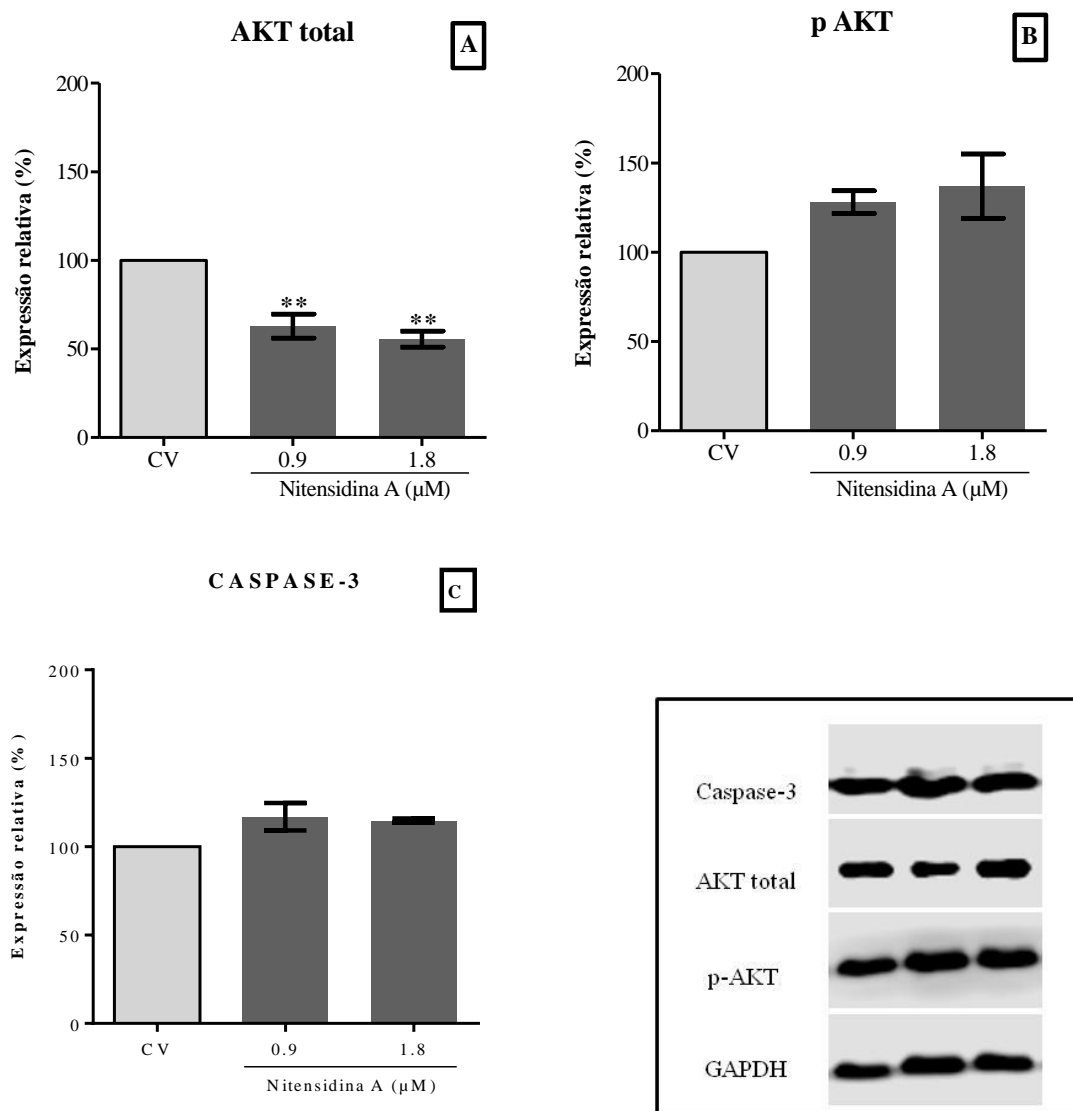
Através do ensaio de determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, podemos observar que para as duas linhagens celulares avaliadas houve diminuição dos níveis de MDA nas duas concentrações testadas de nitensidina A, em comparação ao controle positivo. Para a linhagem HSC-3 houve diminuição estatística significativa em relação ao controle de veículo. Dessa maneira, podemos sugerir que nitensidina A foi capaz de controlar o estresse oxidativo causado na linhagem de carcinoma epidermóide de boca humano. Estudos realizados por Zamri e colaboradores (2014) demonstraram que houve redução no nível de TBARS em células HepG2 tratadas com arroz integral germinado, assim como em nosso estudo.

4.1.5. Western blot das proteínas AKT total, AKT fosforilada e caspase-3

A quantificação dos níveis das proteínas AKT e AKT fosforilada no resíduo de serina 473 e clivagem da proteína caspase-3 foram avaliadas utilizando o ensaio de western blot. Estas proteínas são consideradas chaves quando falamos de metabolismo celular e indução de morte celular, respectivamente.

Frente a essas informações e a importância dessas proteínas nos processos já descritos tratamos com o alcalóide a linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) e linhagem de queratinócito humano (HaCat) por 24 horas. Após esse tempo de tratamento realizamos a extração dessas proteínas e realizamos o protocolo de eletroforese em SDS-PAGE seguido do protocolo de western blot, onde as proteínas foram marcadas com anticorpos específicos. As bandas foram então quantificadas por densitometria, a figura 21 demonstra os resultados obtidos para a linhagem HSC-3.

Figura 21: Expressão dos níveis de AKT, fosforilação de AKT em ser-473 e caspase-3 na linhagem HSC-3.



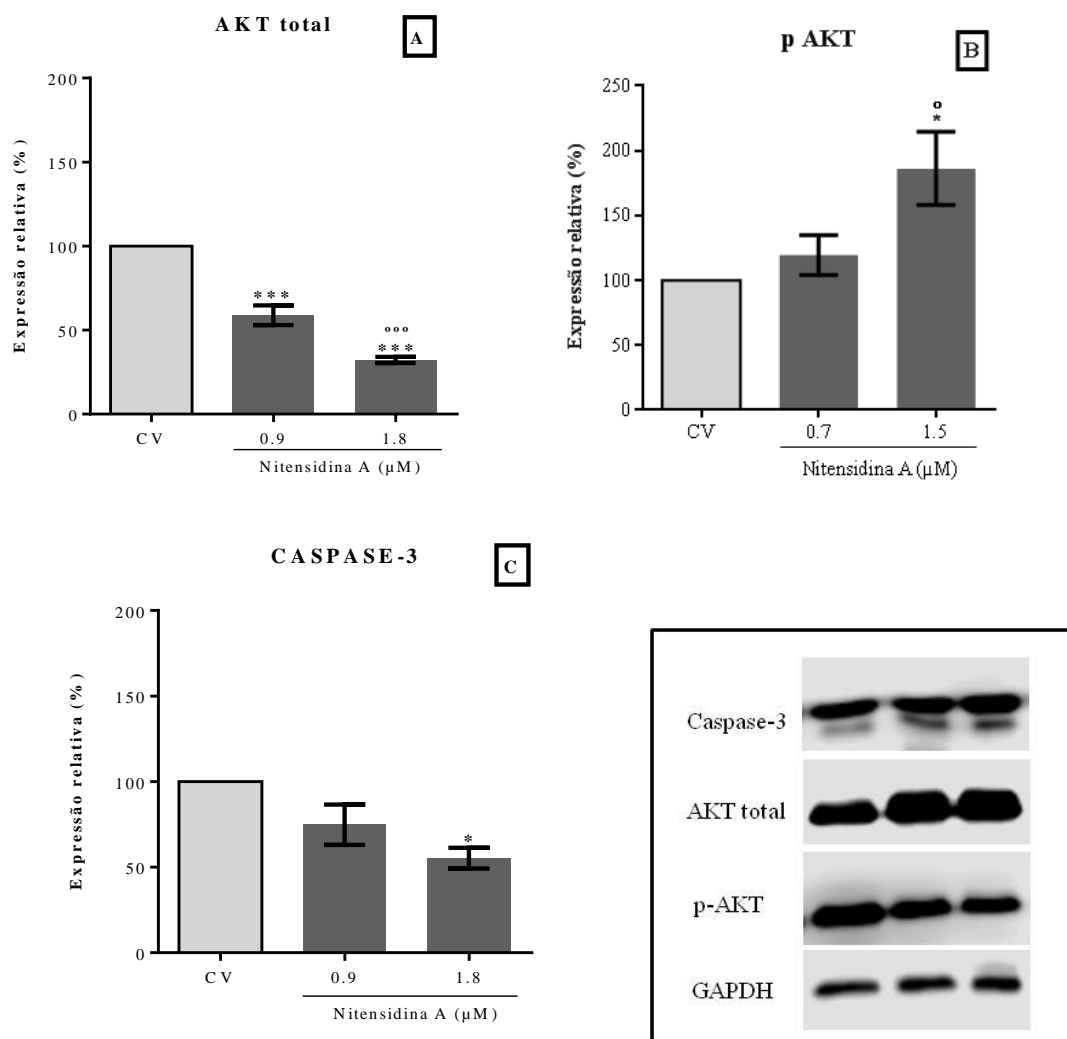
Legenda: Linhagem de carcinoma epidermóide de boca (HSC-3) após tratamento por 24h com nitensidina A. A) Níveis de AKT; B) Níveis de fosforilação de AKT em ser-473 e C) Níveis de caspase-3. Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Para a linhagem HSC-3, observamos redução significativa dos níveis da proteína AKT, quando comparado com a expressão relativa do controle de veículo. Para a proteína fosforilada no resíduo de serina-473, observamos apenas um discreto aumento nas duas concentrações testadas, porém sem apresentar diferença significativa. Na quantificação da proteína caspase-3, notamos que as duas concentrações tendem a

umentar quando comparadas ao controle de veículo, entretanto, sem demonstrar diferença estatística significativa.

A figura 22 demonstra os resultados obtidos na linhagem HaCat.

Figura 22: Expressão dos níveis de AKT, fosforilação de AKT em ser-473 e caspase-3 na linhagem HaCat.



Legenda: Linhagem de queratinócito humano (HaCat) após tratamento por 24h com nitensidina A. A) Níveis de AKT; B) Níveis de fosforilação de AKT em ser-473 e C) Níveis de caspase-3. Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ e diferença entre as duas concentrações ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$).

Na linhagem HaCat, ocorreu a diminuição na porcentagem de expressão relativa da proteína AKT nas duas concentrações testadas, com diferença estatística significativa

em comparação ao controle de veículo e entre elas. A expressão dos níveis de fosforilação de AKT na serina-473 aumentou em resposta ao aumento da concentração de nitensidina A, apresentando diferença significativa na maior concentração testada quando comparadas ao controle de veículo. Os níveis de expressão da proteína caspase-3 diminuiu conforme aumentamos a concentração de nitensidinaA, apresentando diferença significativa quando comparada com a expressão do controle de veículo para a maior concentração testada (1,5 μ M).

As quinase são um tipo de enzima que transfere grupos fosfatos de moléculas doadoras de energia (ATP) para moléculas alvo-específicas (substrato). As proteínas quinases estão presentes em todas as células em forma de complexas redes de processos chaves para o metabolismo celular, atuando como “sensores” no controle e propagação de informação do meio exterior e na organização do seu próprio sistema, o que permite manter uma resposta rápida e apropriada às alterações a que são sujeitas (SEMBA et al., 2003).

AKT é uma quinase específica para treoninas/serinas que se encontra inativa nas células em descanso, tornando-se ativa após fosforilação. A fosforilação da AKT acentua a proliferação celular e sobrevivência celular nesse contexto frente ao fenótipo tumoral facilita a metastização, acarretando na contribuição da resistência celular à quimioterapia e radioterapia. Adquirindo papel primordial no desenvolvimento e progressão tumoral promovendo o crescimento celular e ainda bloqueando a sinalização de morte celular por apoptose (CROWLEY-WEBER et al. 2002, SPARKS e GUERTIN, 2010). Frente a esse fenótipo a quinase AKT tem sido amplamente associada ao desenvolvimento de células tumorais, regulando diretamente o ciclo e a proliferação celular por atuar em CDKI, p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1} e indiretamente pela modulação nos níveis de ciclina D1 e p53 (ZHANG et al., 2011).

Nosso trabalho demonstrou que as duas concentrações testadas do alcalóide nitensidina A na linhagem HSC-3, acarretou na diminuição da expressão relativa dos níveis de AKT total, com diferença significativa quando comparadas ao controle de veículo, e ainda observamos discreto aumento na expressão da AKT fosforilada no resíduo de serina 473, porém sem apresentar diferença estatística significativa. O que sugerimos ser um possível papel de nitensidina A na via de fosforilação da proteína quinase AKT. Para a linhagem HaCat observamos também diminuição da expressão da proteína total, apresentando diferença significativa nas duas concentrações avaliadas de

nitensidina A. Quanto a fosforilação de AKT, notamos o aumento dos níveis de expressão conforme aumentamos a concentração de nitensidina A, apresentando diferença estatística na maior concentração testada (1,5 μ M), podendo então sugerir que esse aumento esteja relacionado com a proliferação do crescimento celular normal para a linhagem de queratinócito humano. Capuano (2005) demonstrou através do ensaio de *western blot* que houve aumento discreto (sem apresentar diferença significativa) na expressão da fosforilação de AKT em linhagens mais invasivas de câncer epidermóide de boca, corroborando assim com nossos resultados para a linhagem HSC-3

Dentro dos mecanismos celulares importantes para a manutenção da estabilidade genômica, podemos relacionar a morte celular programada, apoptose. A ocorrência de perturbação na transdução de sinal ou outros sinais celulares que regulam a atividade celular desencadeiam para o crescimento celular desregulado. Esse fenótipo é relacionado com o perfil de neoplasia. (BLUME-JENSEN & HUNTER, 2001). Dentro da biologia tumoral diversas classes de proteínas e cascatas sinalizadoras são alvos de mutações onde se tornam proteínas com perfil oncogênicos (SEMBA et al., 2002).

A morte celular programada ocorre através da ativação de diferentes alvos, entre eles a clivagem da caspase-3. A liberação do citocromo C mitocondrial, ocorre em fases precoces do processo apoptótico, onde requer a presença de outros fatores citosólicos para a propagação do estímulo para a apoptose (MINAFRA et al., 2014). Assim o citocromo C, se liga a um “fator citosólico associado à apoptose” – Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor – 1*) e a procaspase 9, com a formação do apoptossoma, resultando na ativação da caspase 9. Esta protease, uma vez ativa, cliva outras caspases, as chamadas caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7). A ativação sequencial de uma caspase por outra cria uma extensa cascata de atividade proteolítica que conduz à digestão de proteínas estruturais no núcleo, degradação do DNA e fagocitose da célula (BOTTONNE et al., 2013).

Em nossos resultados notamos que houve discreto aumento de ativação de caspase-3 para a linhagem HSC-3 quando tratadas com nitensidina A, entretanto, não houve diferença estatística significativa. Sendo assim, podemos aludir através do *western blot*, que nitensidina A não promove ativação de caspase-3, corroborando com os dados apresentados no ensaio de ativação de caspase-3 em nosso estudo. Já para a linhagem HaCat observamos que houve diminuição na expressão de caspase-3,

apresentando diferença significativa na maior concentração (1,5 μM) do alcalóide nitensidina A, quando comparadas ao controle de veículo.

Embora a redução nos níveis da AKT fosforilada não fora totalmente evidenciada, não houve aumento significativo para a linhagem HSC-3 tratada com nitensidina A. Este fato pode indicar a possível supressão da via PI3K/AKT, importante para a sobrevivência e proliferação tumoral. Estudos realizados por Matsuo (2015) demonstrou que a via de sinalização PI3K/AKT está ativa em fragmentos cirúrgicos de pacientes diagnosticados com câncer epidermóide.

A via PI3K/AKT está associada ao mTOR (*mammalian target of rapamycin*), uma proteína serina/treonina quinase, que atua distintamente em dois complexos proteicos: mTORC1 e mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 1 e 2*); os quais acoplam sinais de crescimento e disponibilidade de nutrientes, e também estimula a síntese de proteínas pela ativação direta da tradução de mRNA e biogênese de ribossomos (CAIRNS, 2011; BOROUGHS, 2015). Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar a hipótese de que a nitensidina A pode estar relacionada com a via PI3K/AKT, avaliando dessa maneira, o possível mecanismo de morte celular que o alcalóide está envolvido.

4.2. Ensaio *in vivo*

4.2.1. Indução da Carcinogênese

O termo câncer de boca engloba um conjunto de neoplasias que acometem a cavidade bucal em suas mais variadas origens celulares e etiológicas. O carcinoma espinocelular (CEC) ou epidermóide de boca soma mais de 90% dos cânceres dessa região e apresenta elevada taxa de morbidade e mortalidade (INCA 2016).

O processo de carcinogênese do CEC é multifatorial e envolve o consumo de tabaco, álcool, exposição à radiação ultravioleta e mais recentemente a associação ao papilomavírus humano – HPV de alto risco (GILLISON, 2004), envolvendo o sexo oral e mulheres não imunizadas por vacinação contra o HPV (KALAVREZOS & SCULLY, 2015b).

Seu mecanismo de formação foi descrito como envolvendo mutações aleatórias com ativação de proto-oncogenes (KAMB et al., 1994; SACKS et al., 1995) e

inativação de genes supressores de tumor (GONZALEZ et al., 1997; EL-NAGGAR et al., 1997; AI et al., 2003), assim como a adição de características genéticas que levam a capacidade invasiva e metastática. O processo de carcinogênese é considerado distinto entre indivíduos, demonstrando heterogeneidade genética (SHIGA et al., 2012) entre diferentes tumores da região de cabeça e pescoço.

A combinação entre cisplatina, 5-fluorouracil, bleomicina, carboplatina e ifosfamida derivadas de produtos sintéticos, além do paclitaxel (SULTANA et al., 2014) e docetaxel derivados de produtos naturais, estes últimos usados para potencializar o tratamento de casos com metástase ou recorrência do câncer de cabeça e pescoço (PRICE & COHEN, 2012), são as drogas quimioterápicas mais utilizadas no tratamento de câncer de língua, onde a via oral é preferencial pois são mais efetivas e específicas para o controle do crescimento e progressão do câncer (CARRINGTON, 2015).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de novas drogas de origem natural com potencial eficaz no tratamento do câncer de boca (BUNDELA et al., 2015). Cerca de 50 compostos foram relatados no tratamento desse tipo de câncer como o resveratrol, nimbolide, luteolina, isotiocianato de fenetil, emodina aloe, quercetina, ácido elágico, estaurosporina, azadiractina, baicaleína, berberina, genisteína, butein, curcumina, colchicina, pterostilbene, deguelin e andrografolida, de origem natural e os de origem química foram o gefitinib, bortezomib, lovastatina e vorinostat, onde demonstraram (maioria deles) atividade na indução de apoptose e inibição da proliferação de células neoplásicas em modelo *in vitro* e *in vivo* (BUNDELA et al., 2015). Dessa maneira, nosso estudo teve como objetivo simular a carcinogênese oral através do modelo de indução por 4NQO e avaliar o possível efeito do composto natural nitensidina A, isolado de *P. nitens*, contra o câncer de boca.

O processo de oncogênese experimental induzida por Óxido de 4-Nitroquinolina (4NQO) é um modelo padrão que simula a carcinogênese oral humana (TANG et al., 2004) e avalia a eficácia e resistência ao quimioterápico (ZHOU et al., 2010).

O 4NQO é um composto orgânico pertencente à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), solúvel em água e capaz de induzir lesões na cavidade oral dos animais, podendo aumentar o risco individual no desenvolvimento de neoplasias malignas (VISWANADHA, 2011). A administração do 4NQO diretamente na língua ou na água de beber induz carcinoma de células escamosas (KANDARKAR

et al., 1998; RIBEIRO et al., 2004). Acredita-se que seja o melhor carcinógeno químico para a produção de tumores orais em animais (HENRIQUES, 2011), pois consegue simular os três estágios de formação tumoral, a iniciação, promoção e progressão (MINICUCCI et al. 2011), desenvolvendo assim tumores bem diferenciados e com alterações histológicas e moleculares similares as que ocorrem em humanos (TANG et al., 2004).

O modelo de carcinogênese oral induzida por 4NQO em ratos é amplamente utilizado para estudos quimiopreventivos envolvendo o câncer bucal. Em relação à exposição do agente carcinogênico 4NQO nos animais, estudos relatam que a menor dose necessária para o aparecimento de tumores é de 10 ppm (OHNE et al., 1985; VERED et al., 2003) e que em ensaios quimiopreventivos o 4NQO tem sido amplamente utilizado na concentração de 25 ppm (KANDARKAR et al., 1998; TANAKA et al., 2002), assim como em nosso trabalho, sendo administrado via oral na água de beber, durante 8 semanas.

A literatura relata que a aplicação do 4NQO pode ser tanto concomitante (4NQO+substância quimiopreventiva) quanto em momentos distintos (JESUS et al., 2014). Para evitar a reação química direta da nitensidina A com o 4NQO, optamos pela aplicação em momentos distintos. Iniciamos o tratamento (intraperitoneal) com nitensidina A após oito semanas de exposição ao 4NQO, pois a literatura relata que após esse período as fases de iniciação e promoção já ocorreram e a fase de progressão se inicia, sendo estabelecida entre a 8^a e 12^a semana (GRAWISH et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015), e que tumores irão surgir mesmo após a interrupção do 4NQO (FRACALOSSO et al., 2011; JESUS et al., 2014).

A quimioprevenção é definida como mecanismo de controle, regressão ou interrupção dos estágios de iniciação, promoção ou progressão de cânceres utilizando agentes naturais ou sintéticos, os chamados agentes quimiopreventivos ou quimioprotetores (SHROTRIYA et al., 2015; SABA et al., 2015). Nosso tratamento foi introduzido no início da 9^a semana, sendo então realizado na fase de progressão do tumor. Neste momento, o tumor já apresenta as mutações necessárias para o processo final de desenvolvimento. A identificação de efeito antineoplásico nesta fase do processo de carcinogênese estabelece uma forte relação de ação contra tumores já estabelecidos ou em fase final de estabelecimento. Estudos realizados nas fases

anteriores tem o objetivo principal de controlar o surgimento de novas mutações no processo de carcinogênese.

Além disso, nossos resultados anteriores (dados não publicados), relatados por Sorbo (2011), demonstraram redução significativa de CECs em modelo tumoral xenográfico em camundongos *nude* BALB/c com tratamento intra-tumoral de nitensidina A. A opção pelo modelo de indução com 4NQO permitiu a análise da ação da substância em tumores com mutações genéticas aleatórias e individuais completando assim os dados obtido no modelo anterior.

Portanto, o tratamento a partir da 9^a semana com nitensidina A em animais previamente expostos ao 4NQO só obteria resultados clínicos caso influenciasse diretamente o final do desenvolvimento do tumor, seja por aumento de apoptose/necrose, seja pela alteração do padrão proliferativo, ou até mesmo por evitar que novas mutações se somem, levando a aquisição de novas características tumorais (mutagênese). Muitos desses efeitos foram estudados por nós nos resultados *in vitro* e nortearam o desenvolvimento dessa fase experimental (*in vivo*).

Resumidamente, estudos anteriores realizados por Sorbo (2011) em nosso laboratório, demonstraram significativa redução tumoral sobre modelo xenográfico em camundongos *nude* Balb/c, tratados com o alcalóide nitensidina A, avaliando assim seu efeito direto (intra-tumoral). Ainda, os estudos descritos aqui (*in vitro*) relataram o efeito citotóxico de nitensidina A frente a linhagem HSC-3, demonstrando o aumento de apoptose/necrose (perfil de morte misto) nas concentrações testadas por 12 e 24 horas de tratamento, ainda, verificamos aumento significativo de apoptose (células TUNEL positivo). Verificou-se também o efeito mutagênico sob a menor concentração de nitensidina A (7,3 μ M) na linhagem HSC-3. Além disso, identificamos ausência da formação de espécies reativas de oxigênio na análise do ácido tiobarbitúrico (TBARS) sugerindo que o alcalóide nitensidina A não propiciou estresse oxidativo nas células avaliadas.

Diante desses resultados, realizamos o experimento com o modelo de indução tumoral por 4NQO com o intuito de responder as seguintes questões:

- O alcalóide guanidínico nitensidina A foi capaz de impedir a evolução do processo de oncogênese tumoral realizado pelo 4NQO (progressão)?
- A Nitensidina A foi capaz de alterar o padrão de invasão nos CECs induzidos por 4NQO?

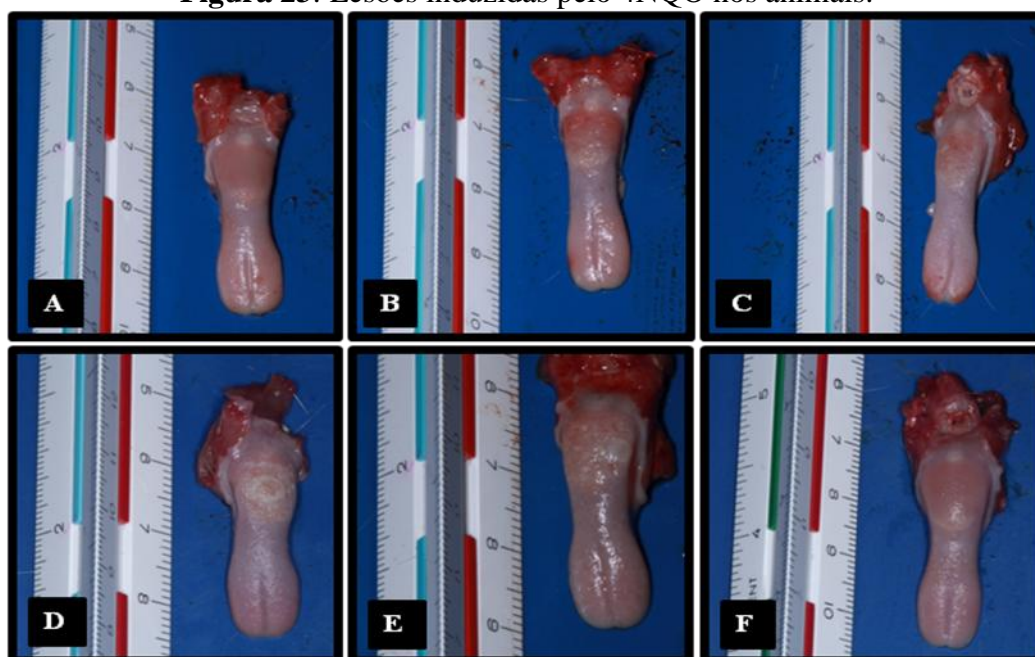
- O aumento de apoptose/necrose observado nos experimentos *in vitro* influenciou no desenvolvimento dos CECs induzidos por 4NQO na fase de progressão?
- Nitensidina A alterou o índice mitótico intra-tumoral nos tumores induzidos por 4NQO?
- Em relação aos parâmetros bioquímicos, ocorreu alteração no nível de glicemia, toxicidade renal e hepática nos grupos estudados?
- Ocorreu alteração nos padrões de oxidação hepática, estomacal, renal, cardíaca ou plasmática nos grupos estudados, por meio do ensaio de TBARS?
- Ocorreu alteração da genotoxicidade nos grupos estudados?

A partir desse momento, apresentamos nossos resultados *in vivo*, respondendo cada uma das questões levantadas.

Inicialmente, apresentamos os dados macroscópicos das línguas dos animais, demonstrando assim o efeito oncogênico da exposição ao 4NQO, situação *sinequanon* para permitir que nossas perguntas pudessem ser respondidas.

As figura 23 demonstra os grupos dos animais e o aparecimento dos tumores (controle positivo e tratamentos), comparados ao grupo normal.

Figura 23: Lesões induzidas pelo 4NQO nos animais.

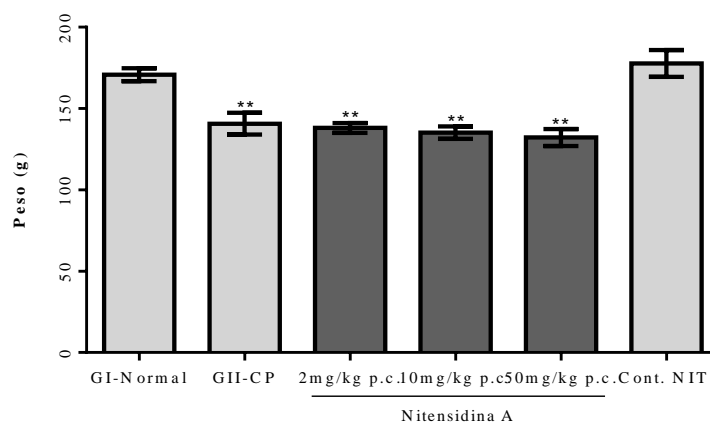


Legenda: A) GI – Grupo Controle Normal; B) GII – Grupo Controle Positivo; C) GIII – Tratamento nitensidina A-2 mg/kg p.c.; D) GIV – Tratamento nitensidina A-10 mg/kg p.c.; E) GV – Tratamento nitensidina A-50 mg/kg p.c.; F) GVI – Grupo Controle nitensidina A (50 mg/kg p.c.).

Os animais foram divididos em 6 grupos. O grupo controle normal (GI) representa animais que não foram expostos ao 4NQO e não foram tratados com o alcalóide guanidínico nitensidina A, o grupo controle positivo (GII) refere-se a animais que foram expostos ao 4NQO por 8 semanas e tratados com DMSO 1%, no qual o composto estudado foi diluído. Os grupos tratados com nitensidina A foram expostos ao 4NQO por 8 semanas e tratados com o alcalóide por mais 8 semanas consecutivas, nas doses: 2 mg/kg p.c. (GIII), 10 mg/kg p.c. (GIV) e 50 mg/kg p.c. (GV). E por fim, o grupo controle nitensidina A (50 mg/kg p.c.) representa animais que tiveram apenas o tratamento com o alcalóide guanidínico por 8 semanas. Os tratamentos foram realizados via intraperitoneal dois dias após a interrupção da exposição ao agente carcinogênico 4NQO.

O peso dos animais também foi demonstrado na figura 24.

Figura 24: Peso dos animais



Legenda: Peso dos animais no final do experimento. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle normal, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$).

A média de peso corporal dos animais no início do tratamento foi em torno de 75 g. Observamos que os grupos de animais que foram expostos ao agente carcinógeno 4NQO demonstraram discreta diminuição em relação ao peso e essa diferença foi diferente estatisticamente comparados aos grupos de animais que não foram expostos ao 4NQO (grupo normal e grupo controle nitensidina A).

4.2.2. Análise Macroscópica

Clinicamente, em humanos, são observadas lesões que são consideradas como “lesões potencialmente malignas”. Essas lesões também são descritas no processo de carcinogênese induzida por 4NQO em ratos. A análise macroscópica das línguas dos animais nos permitiu evidenciar o aparecimento dessas lesões.

Em nosso estudo, as análises macroscópicas foram realizadas por meio de fotos tomadas imediatamente após a eutanásia. As línguas foram divulgionadas após a degola dos animais, sendo delicadamente higienizadas e secas para que obtivéssemos as melhores imagens das lesões. As lesões não foram imediatamente analisadas, uma vez que o tempo despendido nessas análises poderia propiciar o início do processo de necrose dos tecidos, além de atrasar todo o processo de coleta dos demais órgãos, ainda as fotos foram tomadas uma vez que o processo de fixação altera a cor e a textura dos tecidos expostos ao produto. As análises das fotos obtidas foram realizadas por dois examinadores cegos para os grupos de estudo e os resultados conflitantes foram reanalisados até que obtivéssemos consenso. As lesões encontradas, basicamente estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Características das Lesões

Tipo de Lesão	Característica
Mancha Eritematosa	Mancha Vermelha
Nódulo	Maior que 3mm
Placa Branca	Mancha/Placa Branca
Úlcera	Arredondada com profundidade
Mosqueado	Manchas/Placas Vermelha e Branca
Pápula	Menor que 3mm
Papiloma	Elevado e Papilamentoso
Petéquias	Pequenos pontos hemorrágicos subcutâneos

Legenda: Características dos diferentes tipos de lesões encontrados nos grupos controle e tratados.

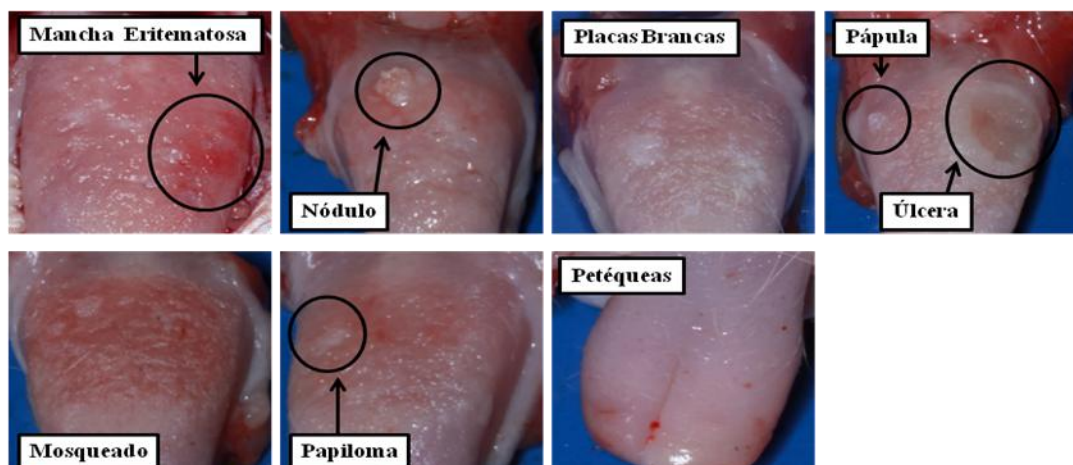
Clinicamente, a observação da presença de lesões macroscópicas faz parte de manobras semiológicas e possibilita o desenvolvimento de ações de diagnóstico precoce na clínica odontológica, sendo fortemente relacionadas com lesões denominadas como

leucoplasia (mancha branca que não sai à raspagem e não pode ser classificada como outra entidade patológica), eritroplasia (mancha vermelha) (MITHANI et al. 2007), lesões nodulares e ulcerativas (BAGAN et al. 2010).

Em nossas análises descrevemos os achados clínicos sem nos preocupar com a caracterização como lesão leucoplásica ou eritroplásica, uma vez que são denominações da clínica odontológica e são relacionadas com a história clínica do paciente. Portanto, adotamos os termos placa branca e mancha eritematosa.

A Figura 25 exemplifica alguns dos diferentes aspectos clínicos observados nessa análise, em animais que foram expostos ao 4NQO.

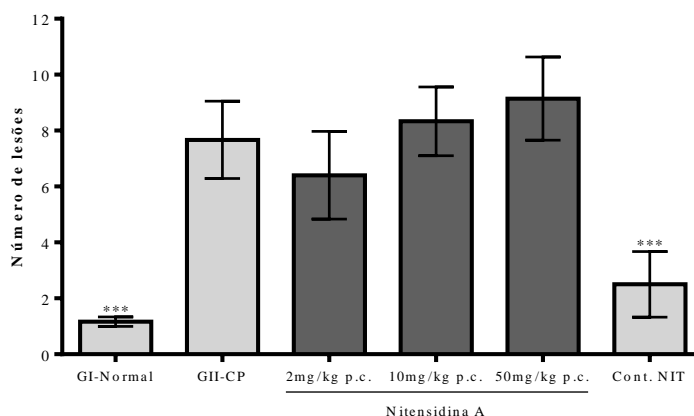
Figura 25: Aspectos Macroscópicos das Lesões



Legenda: Ilustração dos diferentes tipos de lesões encontrados no grupo controle positivo e grupos tratados.

Podemos evidenciar por meio da análise do grupo controle positivo que nosso modelo foi eficiente na indução de lesões potencialmente malignas e malignas, as quais foram bastante semelhantes às evidenciadas em outros estudos (FRACALOSSI et al., 2011; JESUS et al., 2014; MINICUCCI et al., 2011). Sendo assim, consideramos que, caso ocorressem alterações no padrão e número de lesões nos grupos tratados, teríamos um efeito claro sobre o processo final de indução tumoral, positivo ou negativo.

Após a identificação dos diferentes tipos de lesões encontradas nos animais, os resultados foram tabulados e as lesões quantificadas em cada grupo. A figura 26 demonstra o número total de lesões encontradas.

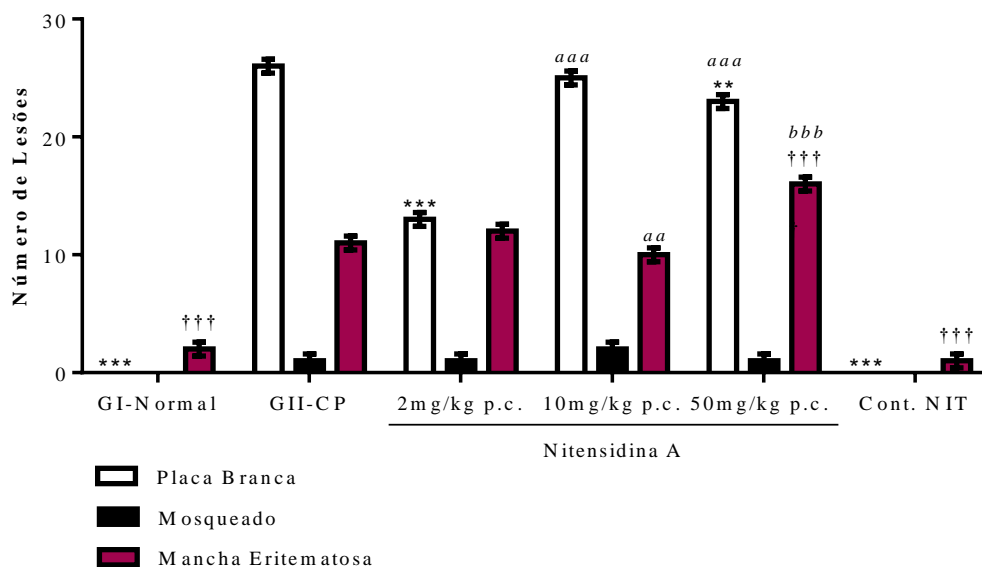
Figura 26: Tipos de Lesões

Legenda: Distribuição do total de lesões entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

Neste caso, verificamos que os grupos controle normal e controle nitensidina A apresentaram reduzida quantidade de lesões, e que estes grupos foram estatisticamente diferentes dos outros grupos do estudo. Este resultado permite concluir que nitensidina A não foi capaz de propiciar o surgimento de lesões clínicas de forma isolada. Do mesmo modo, observamos que os diversos grupos expostos ao 4NQO apresentaram aumento significativo de lesões quando comparados ao grupo controle normal. Nos grupos tratados com diferentes concentrações de nitensidina A, evidenciamos ausência de diferença estatística.

O modelo de indução tumoral através do 4NQO é considerado um excelente sistema experimental na investigação de alterações macroscópicas e na progressão tumoral, demonstrando diferentes lesões clínicas nas línguas dos animais (KANOJIA & VAIDYA, 2006), em nosso trabalho também observamos diferentes lesões clínicas e histológicas semelhantes a carcinogênese oral humana.

Com a finalidade de facilitar a apresentação de nossos resultados clínicos, agrupamos lesões com características semelhantes, ressaltando assim a importância clínica de cada uma no diagnóstico. A figura 27 demonstra os tipos de lesões encontradas em nosso estudo com maior frequência, placas brancas, mancha eritematosa e mosqueado.

Figura 27: Relação entre Placa Branca, Mosqueado e Mancha Eritematosa.

Legenda: Distribuição do número de lesões do tipo placa branca, mosqueado e mancha eritematosa entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); placa branca: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; mosqueado: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ e mancha eritematosa: † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$; ††† $p \leq 0,001$; comparação entre as concentrações: a $p \leq 0,05$ aa $p \leq 0,01$ aaa $p \leq 0,001$ em comparação a 2 mg/kg p.c. de nitensidina A; b $p \leq 0,05$ bb $p \leq 0,01$ bbb $p \leq 0,001$ em comparação a 10 mg/kg p.c. de nitensidina A.

Nosso estudo apresentou expressiva presença de placas brancas (leucoplasias), lesão encontrada com maior frequência em câncer humano da cavidade oral (PIMENTA et al. 2008). Os grupos tratados com nitensidina A apresentaram maior prevalência deste tipo de lesão, porém a menor concentração testada do alcalóide (2 mg/kg p.c.) demonstrou redução estatística significativa quando comparada ao grupo controle positivo. O estudo de Ribeiro (2005) demonstrou que após 20 semanas de exposição ao 4NQO, induzindo a carcinogênese em ratos Wister, alguns animais também demonstraram presença de placas brancas.

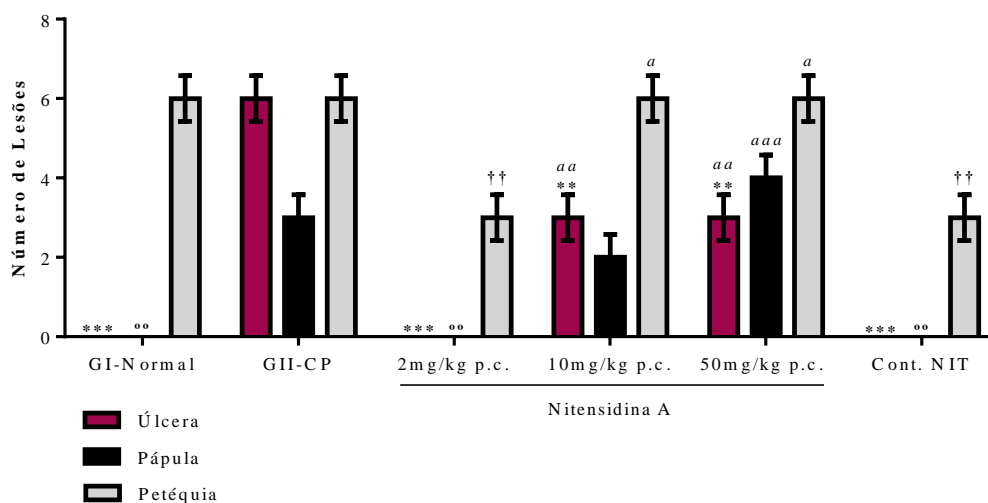
As placas brancas tem grande importância na clínica diagnóstica em humanos. Na clínica odontológica estas lesões são chamadas de “Leucoplasias” e são classificadas em homogêneas e não homogêneas, sendo inclusive analisadas quanto à presença de diferentes graus de displasia e, até mesmo, sendo proposto o estadiamento clínico das leucoplasias, comumente aplicado para classificação de prognóstico em neoplasias malignas (SCHEPMAN & VAN DER WAAL, 1995). Além deste aspecto, se faz necessário relatar a óbvia e indiscutível correlação de evolução destas lesões. Vasta

literatura descreve o potencial de transformação maligna das leucoplasias, citamos aqui o artigo de Schepman e colaboradores (1998) que relatam o acompanhamento de 166 pacientes com diagnóstico clínico de leucoplasia e apresentam taxa de 2,9 % de malignização das mesmas. Por fim, relatamos que a menor dose de nitensidina A (2 mg/kg p.c.) demonstrou a redução estatística do número de placas brancas (leucoplasias), quando comparada as outras doses administradas.

Quando analisamos o número de manchas eritematosas em nosso trabalho, podemos notar que embora tenha sido um número menor de animais que apresentaram esse tipo de lesão, comparados com as placas brancas, notamos que houve diferença estatística significativa na maior dose administrada de nitensidina A (50 mg/kg p.c.), comparada ao grupo controle positivo e as outras doses de tratamento, demonstrando aumento significativo. As concentrações de 2 mg/kg p.c. e 10 mg/kg p.c. demonstraram perfil semelhante ao grupo controle positivo. A presença de mancha eritematosa apresenta diferentes origens possíveis, e descreve apenas o aspecto clínico que pode ser pormenorizado em sua análise quando estudamos os aspectos histopatológicos. Em relação ao número de áreas com aspecto mosqueado, notamos que as três doses de nitensidina A demonstraram o mesmo perfil do grupo controle positivo.

Outros tipos de lesões avaliados em nosso experimento foram as lesões caracterizadas como úlcera, pápulas e petéquias, demonstradas na figura 28.

Úlcera ou lesões ulcerativas são lesões que se caracterizam pela perda de camadas do tecido epitelial havendo exposição do tecido conjuntivo subjacente. São lesões de caráter crônico e que podem persistir por mais tempo. As pápulas são lesões de tamanho pequeno, sólidas, circunscritas e elevadas, cujo diâmetro não ultrapassa 5 mm, podendo ser únicas ou múltiplas.

Figura 28: Relação entre Úlcera, Pápula e Petéquia.

Legenda: Distribuição do número de lesões do tipo úlcera, pápula e petéquia entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); úlcera: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; pápula: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ e petéquia: † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$; ††† $p \leq 0,001$; comparação entre as concentrações: a $p \leq 0,05$ aa $p \leq 0,01$ aaa $p \leq 0,001$ em comparação a 2 mg/kg p.c. de nitensidina A.

Estudos realizados por Ribeiro e colaboradores (2004), demonstraram que animais expostos ao 4NQO (50 ppm) apresentaram após 12 semanas lesões ulcerativas, assim como em nosso estudo, no qual o grupo controle positivo apresentou maior prevalência de diagnóstico clínico de ulceração quando comparado com todos os demais grupos estudados. Neste tocante, as três doses de tratamento com nitensidina A apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle positivo. A concentração de 2mg/kg p.c. demonstrou ausência de diagnóstico clínico de ulceração sendo estatisticamente menor que os grupos tratados com 10 mg/Kg p.c e 50 mg/Kg p.c. de nitensidina A.

Quando observamos o número de animais que apresentaram pápula, notamos que a maior dose de nitensidina A (50 mg/kg p.c.) teve aumento significativo de lesões. A menor dose tratada com o alcalóide (2mg/kg p.c.) não apresentou nenhum animal com este tipo de lesão, demonstrando assim diferença estatística significativa.

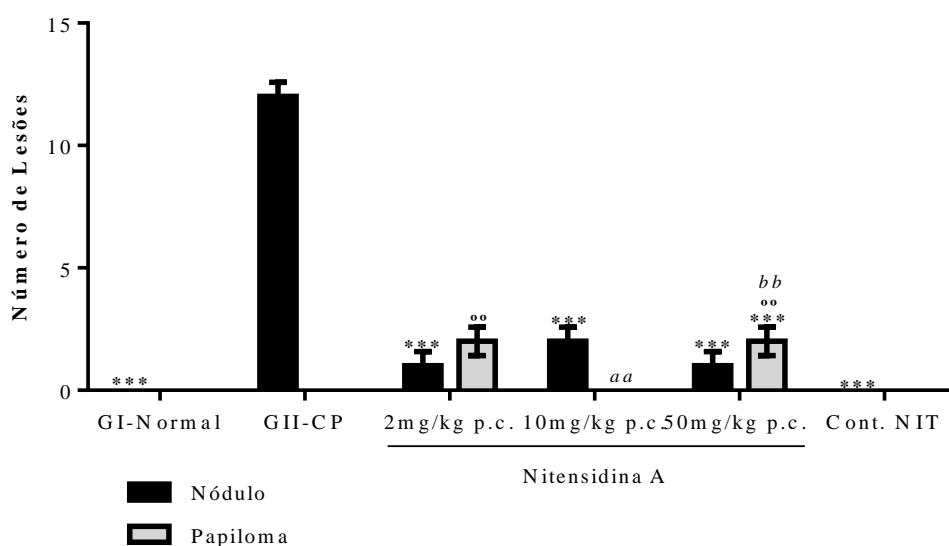
Na análise da presença de petéquias notamos que houve diminuição na dose de 2mg/kg p.c. de nitensidina A, sendo diferente estatisticamente, em comparação ao grupo controle positivo. As petéquias são descritas como expressão clínica de processos

hemorrágicos subcutâneos. Estes processos hemorrágicos podem ocorrer sob trauma na região ou por meio de alterações em fatores de coagulação.

Nossos resultados apresentam também os dados relativos à quantificação de lesões do tipo nódulo e papiloma (figura 29).

Nódulos são lesões sólidas, circunscritas de localização superficial ou profunda, formado por tecido epitelial, conjuntivo ou misto. Podem ser sésseis, quando sua base de implantação for maior que sua altura, ou pediculado, quando sua altura é maior. Os papilomas são exemplos de lesões nodulares.

Figura 29: Relação entre Nódulo e Papiloma



Legenda: Distribuição do número de lesões do tipo nódulo e papiloma entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); nódulo: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ e papiloma ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$; comparação entre as concentrações: *a* $p \leq 0,05$ *aa* $p \leq 0,01$ *aaa* $p \leq 0,001$ em comparação a 2 mg/kg p.c. de nitensidina A; *b* $p \leq 0,05$ *bb* $p \leq 0,01$ *bbb* $p \leq 0,001$ em comparação a 10 mg/kg p.c. de nitensidina A.

Notamos que houve elevado número de lesões nodulares nos animais do grupo controle positivo e que as três doses do alcalóide nitensidina A demonstraram redução estatística significativa. Em relação ao número de papilomas encontrados, notamos que apenas as doses 2 mg/kg p.c. e 50 mg/kg p.c. apresentaram pequeno número de animais com esse tipo de lesão.

A literatura relata que os animais tratados com 4NQO apresentam evolução de lesões clínicas que culminam em tumores malignos infiltrativos, sendo relatadas placas brancas, manchas vermelhas, lesões mosqueadas, ulceradas, papilomatosas e nodulares.

Lesões nodulares e papilomas encontram-se no final deste processo de evolução clínica oncogênica, mas podem surgir tumores malignos que não necessariamente apresentaram as diversas expressões clínicas do processo de oncogênese.

4.2.3. Análise Microscópica

As análises microscópicas e resultados histopatológicos foram realizadas por patologista oral cego para todos os grupos. Foram identificadas as seguintes alterações histopatológicas epiteliais: grau de displasia (I – leve e moderada; II - grave), tipo de carcinoma (*in situ*, micro-invasivo e/ou invasivo), invasão de tecidos (muscular, glandular e/ou tecido adiposo), acantose e hiperqueratose. As línguas foram divididas e seccionadas no sentido ápice/base a cada 3,0 mm. Todas as seções foram incluídas e cortadas para análise histopatológica, tomando-se cuidado para não incluir a mesma face em dois cortes subsequentes.

O grau de displasia evidenciado em análises histológicas de tecidos obtidos da boca tem grande importância clínica, uma vez que existem estudos que correlacionam sua evolução com a possibilidade de surgimento de neoplasias malignas. Também existem relatos de alta porcentagem de malignização de lesões displásicas (12,1%). É de grande relevância analisar a displasia encontrada em cada grupo, classificando o grau em que se apresentam, pois podem evoluir de displasia leve e moderada para grave e finalmente carcinoma *in situ*.

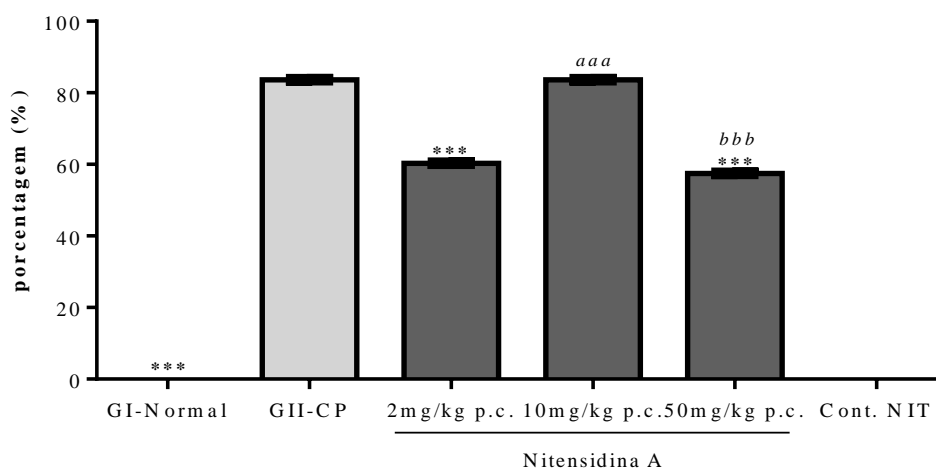
Estudos apoiam o conceito de que o desenvolvimento de vários tipos de câncer está diretamente associado a fatores ambientais que levam a alterações no DNA produzindo mutações e modificações no material genético. O mecanismo de desenvolvimento do câncer é descrito em três fases: INICIAÇÃO, que envolve exposição a um carcinógeno e sua interação com o DNA, provocando uma mutação genética. Neste momento, genes supressores de tumor podem parar o processo de mitose e corrigir o defeito genético adquirido ou ativar o processo de apoptose. Caso ocorra a mutação em proto-oncogenes essas mutações podem se tornar permanentes e a próxima fase do processo de oncogênese se iniciar (promoção) (LOTAN et al., 1995).

Na fase de PROMOÇÃO, após o processo de iniciação, as células transformadas podem adquirir novas mutações que levarão ao aumento do potencial proliferativo e/ou perda de controle restritivo intercelular, propiciando autonomia de manutenção,

proliferação e diferenciação/desenvolvimento. Ao atingirem estas características inicia-se a fase de **PROGRESSÃO**, que é o processo pelo qual são ultrapassados os mecanismos que regulam a replicação celular, como por exemplo os genes de supressão tumoral (p53) estabelecendo-se o fenótipo maligno (LOTAN et al., 1995). De fato, surgem subpopulações celulares que propiciam o aumento das características malignas. O tumor aumenta em tamanho e passa a invadir tecidos vizinhos e, por fim, estabelece características que permitem o desenvolvimento de metástases (DIAS, 1999).

As alterações celulares que resultam na exposição da mucosa bucal aos agentes cancerígenos, inicialmente se manifestam por lesões inflamatórias inespecíficas. Se ocorrer uma agressão intensa e prolongada, o desenvolvimento de displasias poderá ser encontrado. A displasia de grau leve e moderado corresponde a alterações celulares que se restringem a camada basal, ou que podem atingir o terço médio do epitélio, enquanto que na displasia de grau grave as alterações podem alcançar o terço superior (SCHANTZ et al., 1993). Em nosso estudo nenhum animal apresentou displasia de grau II (displasia grave), havendo apenas displasia de grau I (displasia leve e moderado) (figura 30).

Figura 30: Porcentagem de Displasia – Grau I

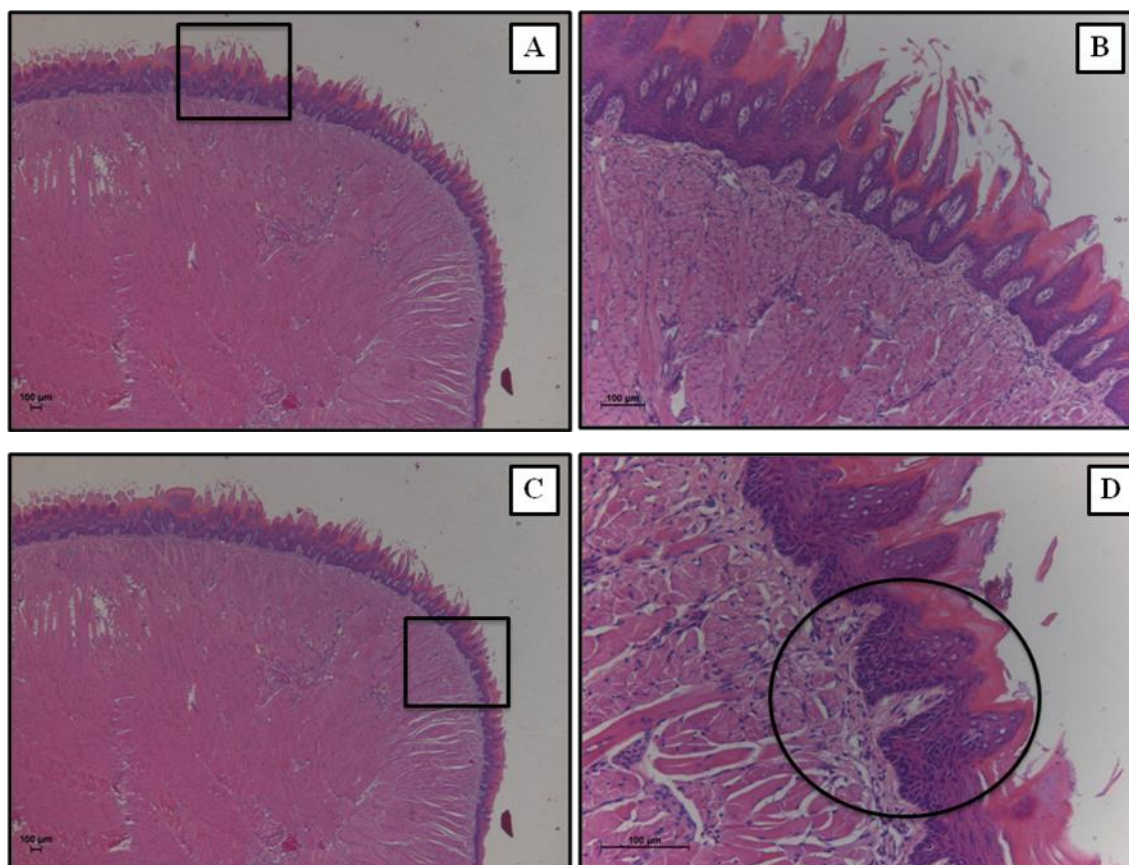


Legenda: Distribuição da porcentagem de displasia entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

Nossos resultados demonstraram que as doses 2 mg/kg p.c e 50 mg/kg p.c., tratadas com nitensidina A apresentaram diferença estatística significativa quando

comparados ao grupo controle positivo, demonstrando diminuição de displasia. Estudos realizados por Jesus e colaboradores (2014) demonstraram que animais expostos ao 4NQO (20 ppm) durante 8 semanas apresentaram displasia, assim como seu grupo tratado (suco de uva isolado e concomitante ao 4NQO), corroborando com nossos dados. A figura 31 apresenta áreas de epitélio normal e de displasia encontradas em nossos estudos.

Figura 31: Análise histológica.



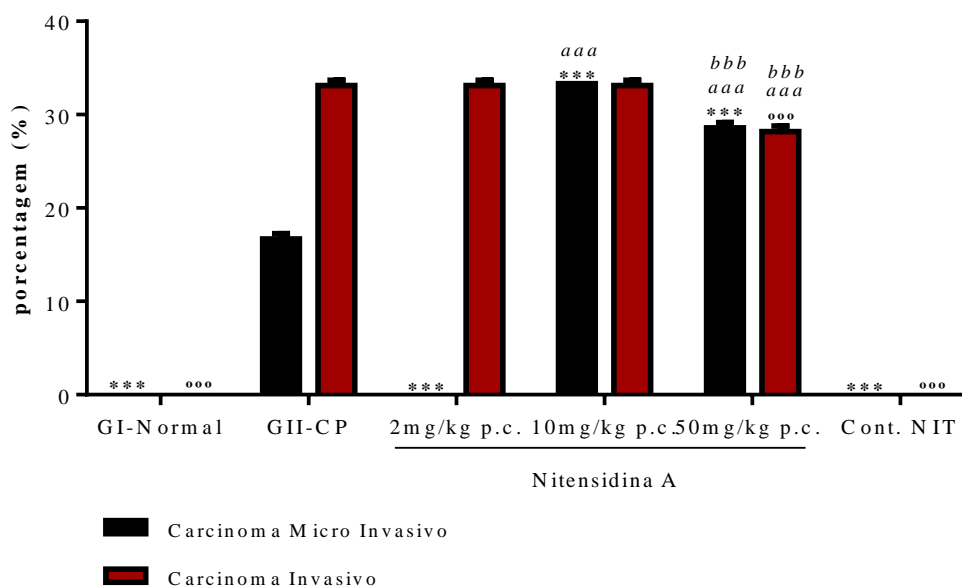
Legenda: Fitomicrografias de língua (Hematoxilina & Eosina). Grupo controle positivo. A) Aumento de 4x, demonstra região da fitomicrografia B; B) aumento de 10x – epitélio normal com papilas filiformes; C) Aumento de 4x, demonstra região da fitomicrografia D; D) detalhe em aumento de 20x – displasia moderada.

A displasia pode evoluir para um carcinoma *in situ*, cujo conceito teórico básico descreve como sendo a transformação maligna que já ocorreu, mas não se evidencia o processo de invasão dos tecidos circunvizinhos (WHO, 2005), portanto, caracteriza-se por apresentar modificações celulares correspondentes a uma exacerbação das características displásica, com alterações na diferenciação, crescimento e proliferação celular, acentuadas por maior grau de pleomorfismo celular e nuclear, mas limitando-se ao crescimento em sua área de origem.

Clinicamente, o carcinoma *in situ* assemelha-se a uma leucoplasia (tipo particular de metaplasia), manifestando-se como uma mancha ou placa branca, não removida por raspagem. Em outras ocasiões, pode aparecer como área vermelha ou com a combinação desses aspectos (mosqueado) assim como em lesões nodulares ou papilomatosas. Quando ocorre a ruptura da membrana basal, temos o carcinoma micro-invasivo, este pode evoluir para carcinoma invasivo, atingindo os tecidos circunvizinhos e, muitas vezes, demonstrando aspecto ulcerado, com bordas nítidas, irregulares e endurecidas, característica fortemente relacionada com estes tumores (SCHANTZ et al., 1993). A lesão pode se manter assintomática por período variável, mas quando ocorrer dor, esta costuma ser relacionada com a invasão profunda da musculatura e de fibras nervosas (KIGNEL et al., 2015). O carcinoma *in situ* e micro-invasivo, se forem adequadamente tratados, apresentam excelente prognóstico.

Na evolução clínica do câncer de cavidade oral, podemos destacar três estágios distintos: *in situ*, micro-invasivo e invasivo, observado em nosso trabalho pela figura 32.

Figura 32: Tipos de Carcinoma

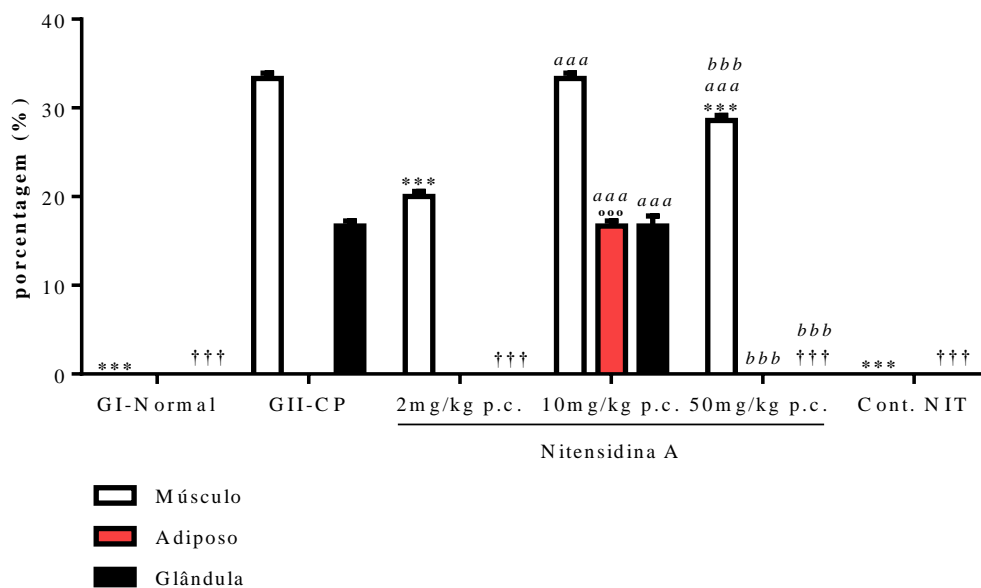


Legenda: Distribuição da porcentagem do tipo de carcinoma micro-invasivo e invasivo entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); carcinoma micro-invasivo: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ e invasivo: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$; comparação entre as concentrações: *a* $p \leq 0,05$ *aa* $p \leq 0,01$ *aaa* $p \leq 0,001$ em comparação a 2 mg/kg p.c. de nitensidina A; *b* $p \leq 0,05$ *bb* $p \leq 0,01$ *bbb* $p \leq 0,001$ em comparação a 10 mg/kg p.c. de nitensidina A.

No presente estudo, observamos que nenhum grupo estudado apresentou carcinoma *in situ* e que as duas maiores doses do alcalóide nitensidina A, 10 e 50 mg/kg p.c. demonstraram $66,44\% \pm 0,58$ e $56,76\% \pm 0,60$ de carcinoma (micro-invasivo e invasivo), respectivamente. A menor dose (2 mg/kg p.c.) do composto nitensidina A apresentou apenas porcentagem de carcinoma invasivo ($33,11 \pm 0,57$), e não demonstrou nenhum animal com carcinoma micro-invasivo, demonstrando diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle positivo ($16,67\% \pm 0,55$).

O prognóstico dos pacientes diagnosticados com CEC oral é fortemente relacionado ao tamanho do tumor e com a invasão dos tecidos circunvizinhos, assim como a metástase loco regional em linfonodos. Este aspecto pode ser observado quando verificamos os parâmetros que estadiam prognóstico para este tipo de tumor. De fato, a variável T no sistema TNM da Organização Mundial da Saúde para CEC oral e de lábio, apresenta os três primeiros níveis (T1, T2 e T3) detalhando tamanho do tumor e T4 caracteriza a invasão dos tecidos circunvizinhos. O mesmo pode ser observado quando analisamos a variável N nesta mesma classificação, que detalha o processo de metástase loco-regional tanto do ponto de vista ipsilateral, contralateral e bilateral, assim como o tamanho desta metástase (3 ou 6 cm) (WHO, 2005).

Em nosso trabalho, analisamos se houve invasão muscular, glandular ou no tecido adiposo (figura 33).

Figura 33: Tipos de Invasão

Legenda: Distribuição da porcentagem de invasão muscular, glandular e no tecido adiposo entre os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A e os grupos controles. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); invasão muscular: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; tecido adiposo: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$; glandular: † $p \leq 0,05$; †† $p \leq 0,01$; ††† $p \leq 0,001$; comparação entre as concentrações: *a* $p \leq 0,05$ *aa* $p \leq 0,01$ *aaa* $p \leq 0,001$ em comparação a 2 mg/kg p.c. de nitensidina A; *b* $p \leq 0,05$ *bb* $p \leq 0,01$ *bbb* $p \leq 0,001$ em comparação a 10 mg/kg p.c. de nitensidina A.

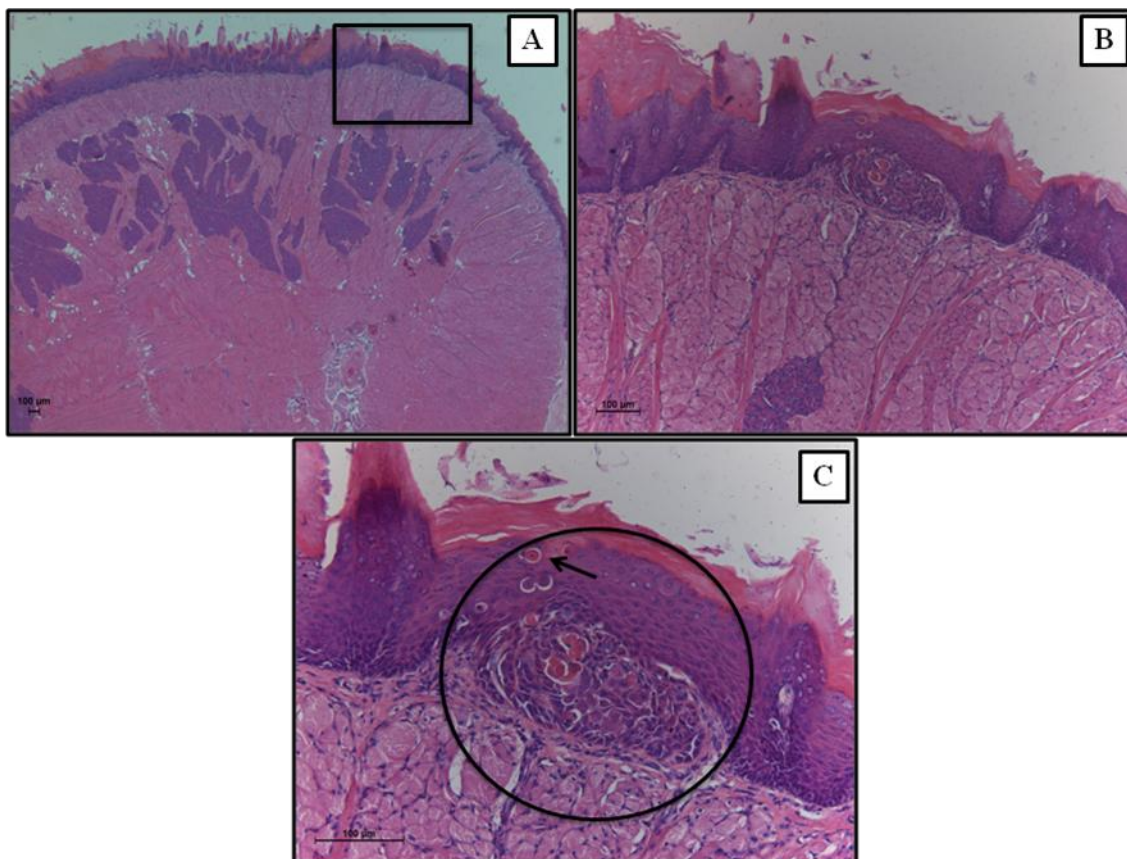
Podemos notar em nosso estudo, que as doses de 10 mg/kg p.c. ($33,33\% \pm 0,57$) e 50 mg/kg p.c. ($28,57 \pm 0,51$) de nitensidina A demonstraram maior número de animais com invasão muscular, assim como o grupo controle positivo ($33,33\% \pm 0,57$). Porém a menor dose testada do alcalóide (2 mg/kg p.c.) demonstrou redução estatística significativa de invasão muscular ($20,00\% \pm 0,56$) quando comparada ao grupo controle positivo e as outras doses administradas via intraperitoneal. Apenas os grupos controle positivo e 10 mg/kg p.c. apresentaram animais com invasão em tecido glandular e este último também apresentou invasão de tecido adiposo. Sorbo (2011) no modelo de indução xenográfico em camundongos *nude* BALB/c tratados com nitensidina A (intratumoral), demonstrou que houve invasão tumoral nos tecidos circunvizinhos dos animais, e que essa invasão foi menor do que a evidenciada nos animais do grupo controle negativo (animais apenas com tumor, sem tratamento), corroborando assim com nossos resultados. A inibição farmacológica da motilidade celular pode beneficiar o tratamento clínico, prevenindo a invasão e metástase em órgãos internos (COLLISSON et al., 2003; MATSUDA et al., 2011)

O estudo de Favero e colaboradores (2010) que teve como objetivo, correlacionar a infiltração perineural e o padrão de invasão muscular em carcinoma epidermóide avançado de boca e orofaringe, com a evolução dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico, demonstrou que dos 33 casos, 84,9% apresentaram invasão muscular, demonstrando a grande importância deste padrão de invasão na análise histológica dos CEC orais em nossos dados. Embora nosso estudo fora realizado em animais através do modelo experimental de carcinogênese induzida por 4NQO, nossos resultados demonstram paralelismo claro com os observados pelos autores supracitados, mais ainda quando consideramos que nosso estudo primou pela análise nos momentos iniciais do desenvolvimento tumoral, com nosso sacrifício ocorrendo com 16 semanas de tratamento.

Outras metodologias demandam sacrifícios em momentos mais avançados do desenvolvimento tumoral, com eutanásias realizadas após 32 semanas ou mais. Mas também devemos levar em consideração que os tumores observados neste modelo de estudo ocorrem com maior frequência na língua dos animais, onde o tecido muscular se faz presente em grande monta.

A figura 34 nos apresenta área de carcinoma epidermóide invasivo.

Figura 34: Análise Histológica – Carcinoma epidermóide invasivo



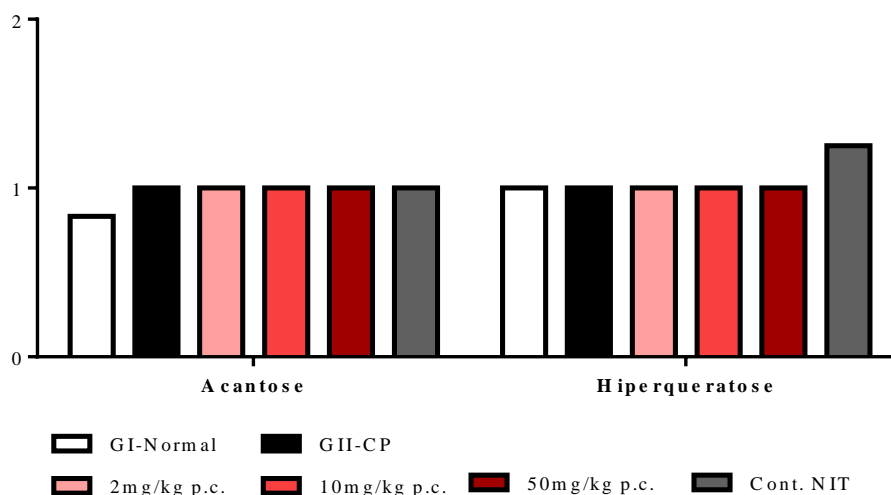
Legenda: Fitomicrografias de língua (Hematoxilina & Eosina). Grupo tratado com 2 mg/kg p.c. de nitensidina A. A) Fitomicrografia em aumento de 2,5x, apresentando a região onde observamos o carcinoma epidermóide detalhado em B e C em maiores aumentos; B) aumento de 10x – massa neoplásica no interior do conjuntivo, acima do tecido muscular esquelético; C) aumento de 20x – observe a disqueratose (seta), hiper Cromatismo nuclear e pleomorfismo.

O processo de carcinogênese induzida por 4NQO demonstra lesões epiteliais hiperplásicas (acantose e hiperqueratose), sendo correlacionada com o desenvolvimento do processo neoplásico associado à exposição ao carcinógeno. Lesões definidas por acantose relacionam-se ao aumento da espessura da epiderme e lesões como a hiperqueratose, associam-se ao espessamento da camada mais externa da epiderme (estrato córneo), muitas vezes com presença de uma quantidade anormal de queratina e geralmente acompanhada por um aumento na camada granular (TANGA et al., 2014).

Nosso estudo não apresentou diferença entre os grupos nesta análise. Entretanto, analisamos toda a língua, desde o ápice até a base. Como a língua apresenta diferenças de espessura e queratinização conforme a região que é analisada, este aspecto pode ter sido diluído na análise, perdendo força estatística.

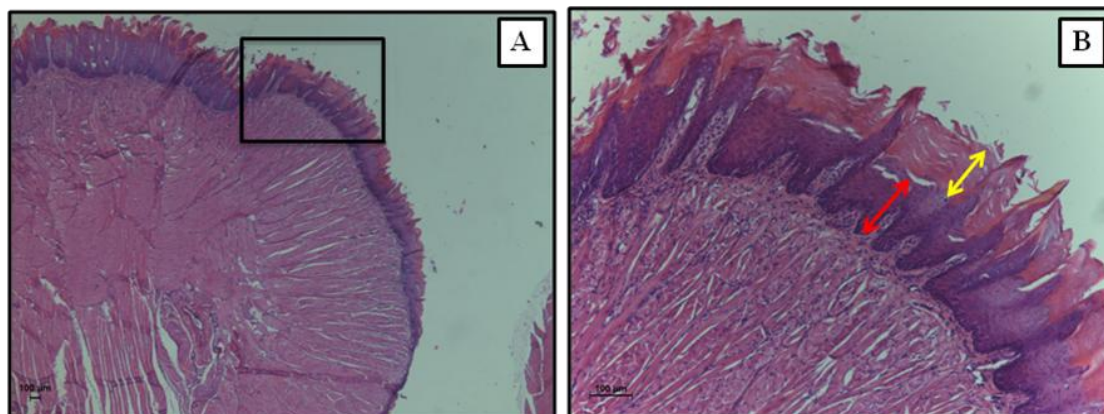
A figura 35 demonstra a relação entre as lesões epiteliais encontradas em nosso estudo.

Figura 35: Relação entre as lesões Acantose e hiperqueratose



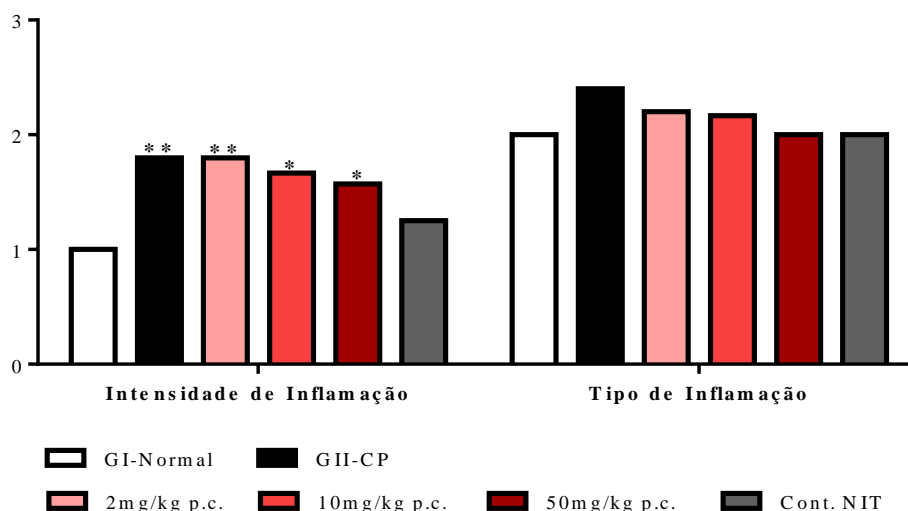
Legenda: Classificação das lesões epiteliais hiperplásicas: Acantose e Hiperqueratose. No eixo Y do gráfico, apresentamos a codificação utilizada para a análise estatística. Análise do epitélio: 0=atrofia epitelial; 1= epitélio normal; 2 = Acantótico. Análise do estrato córneo: 0 = ausência da camada de queratina; 1= camada queratina normal; 2 = hiperqueratose. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way*ANOVA com pós-teste de Bonferroni (todos os grupos *vs* grupo controle normal).

Não observamos diferenças estatísticas significantes entre os grupos em relação à presença de acantose e hiperqueratose em comparação ao grupo controle normal. Todos os grupos demonstraram presença de regiões de epitélio e estrato córneo normais fora das áreas de carcinoma. Neste ponto, convém salientar que as línguas dos animais foram inteiramente incluídas no processamento, sendo seccionadas a cada 3 mm e todos os cortes foram analisados. Qualquer região contendo acantose ou hiperqueratose foi registrada. Processos acantóticos ou hiperqueratóticos também surgem em resposta a estímulos crônicos ou processos inflamatórios persistentes. A figura 36 demonstra histologicamente regiões com acantose e hiperqueratose.

Figura 36: Análise Histológica: Acantose e Hiperqueratose

Legenda: Língua (Hematoxilina & Eosina). Grupo tratado com 50 mg/kg p.c. de nitensidina A. A) aumento de 2,5x, detalhe que identifica a região observada em B; B) aumento de 10x – presença de acantose (seta vermelha) e hiperqueratose (seta amarela).

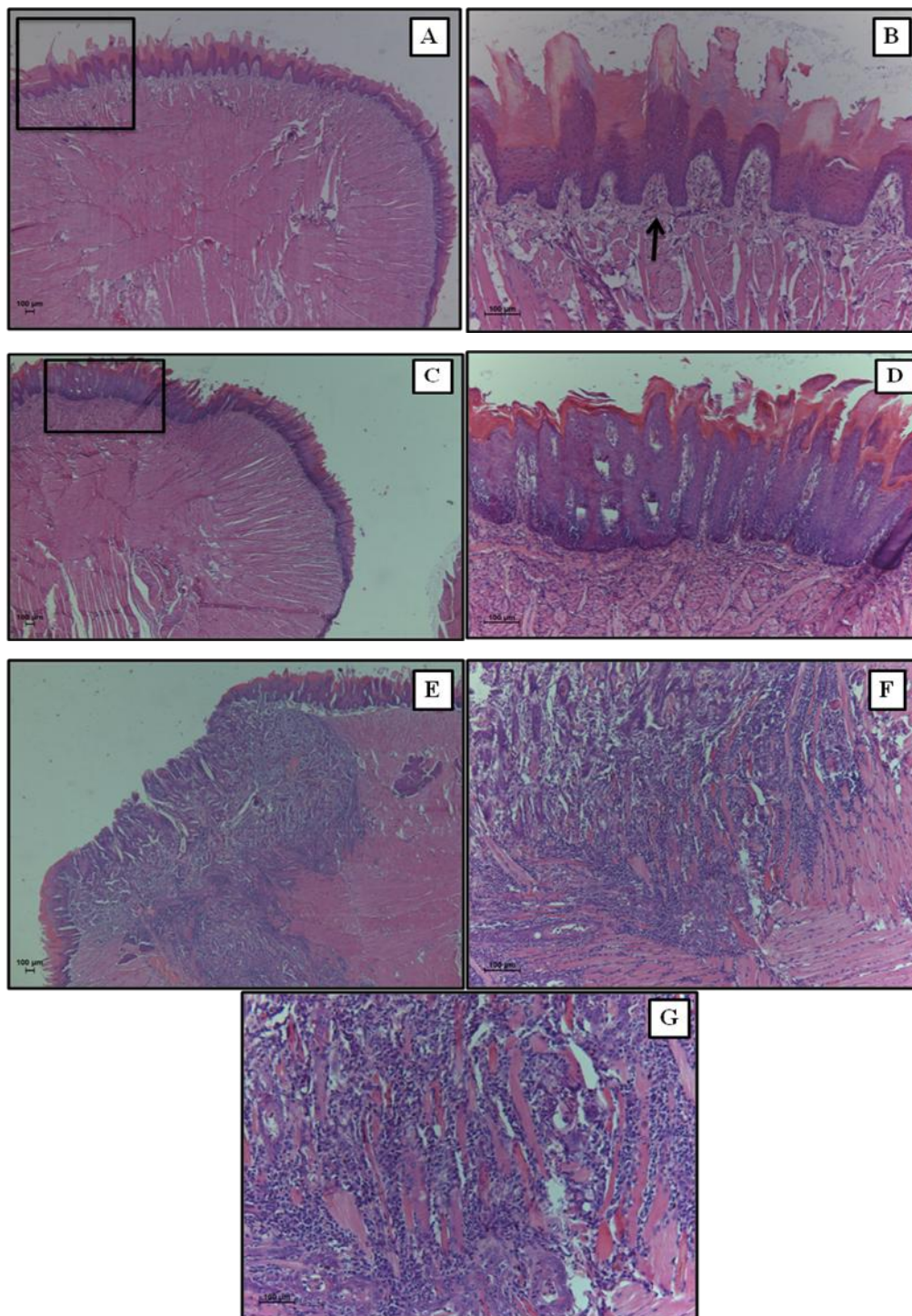
A presença de reposta inflamatória em processos oncogênicos é relatada na literatura como relacionada com parte do processo de combate ao tumor ou como um mecanismo tumoral para auxiliar na produção de vasos para seu suprimento sanguíneo. Nosso estudo classificou a intensidade e o tipo da resposta inflamatória. Para intensidade de inflamação classificamos em leve, moderada e forte e para tipo de inflamação classificamos em aguda, crônica e mista. A figura 37 demonstra os resultados das análises de intensidade e tipo de resposta inflamatória nos diferentes grupos analisados.

Figura 37: Relação entre intensidade e tipo de inflamação.

Legenda: Classificação da intensidade de inflamação: 1 = leve; 2 = moderada e 3 = forte. Classificação do tipo de inflamação: 1 = aguda; 2 = crônica e 3 = mista. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni (todos os grupos *vs* grupo controle normal) * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

O grupo normal apresentou intensidade de inflamação leve. Os grupos tratados com nitensidina A nas três doses testadas apresentaram resposta inflamatória de leve a moderada, demonstrando diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle normal. A menor dose testada (2 mg/kg p.c.) foi o que apresentou maior intensidade da resposta inflamatória, isso pode estar relacionado com a diminuição do número de carcinomas encontrados nesse grupo.

Em relação ao tipo de resposta inflamatória, todos os grupos demonstraram resposta eminentemente crônica, exceto o grupo controle positivo que tendeu a apresentar resposta do tipo mista. A relação do tipo de inflamação em nosso estudo não demonstrou diferença estatística significativa em nenhum dos grupos avaliados, quando comparados ao grupo controle normal. A figura 38 mostra histologicamente regiões com inflamação.

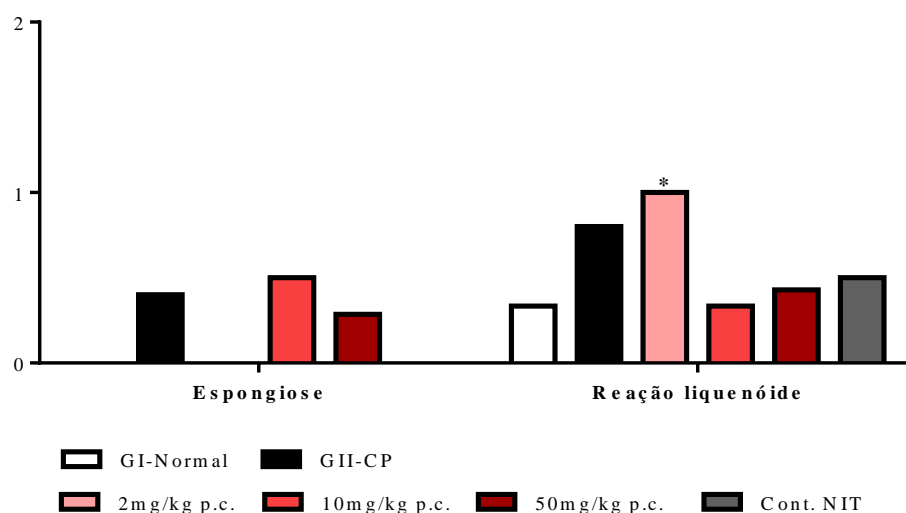
Figura 38: Intensidade e Tipo de Inflamação.

Legenda: Língua (Hematoxilina & Eosina). Grupo tratado com 50 mg/kg p.c. de nitensidina A. A) Região da língua onde observamos o detalhe em B - Inflamatório Crônico/Leve (2,5x); B) Inflamatório Crônico/Leve (10x); C) Região da língua onde observamos Inflamatório Crônico/Moderado detalhado em D (2,5x); D) Inflamatório Crônico/Moderado (10X); E) região da língua onde observamos Inflamatório Misto/Forte e Carcinoma Invasivo Muscular, detalhados em F e G; F) Inflamatório Misto/Forte e Carcinoma Invasivo Muscular (10x) e G) Inflamatório Misto/Forte e Carcinoma Invasivo Muscular (20x).

Também analisamos a presença de espongiose, que são ninhos de células inflamatória no interior do epitélio, neutrófilos ou células mononucleares, e a presença de reação liquenóide, que é o processo de ataque de células inflamatórias crônicas ao epitélio assemelhando-se ao evidenciados em Liquen Plano (PINKUS, 1973).

A figura 39 demonstra os resultados obtidos em relação à espongiose e reação liquenóide.

Figura 39: Relação entre espongiose e reação liquenóide.



Legenda: Classificação das alterações inflamatórias: espongiose e reação liquenóide. 0= ausente; 1= presente; 2 = mais de uma reação liquenóide no mesmo animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *two-way*ANOVA com pós-teste de Bonferroni (todos os grupos vs grupo controle normal) * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$.

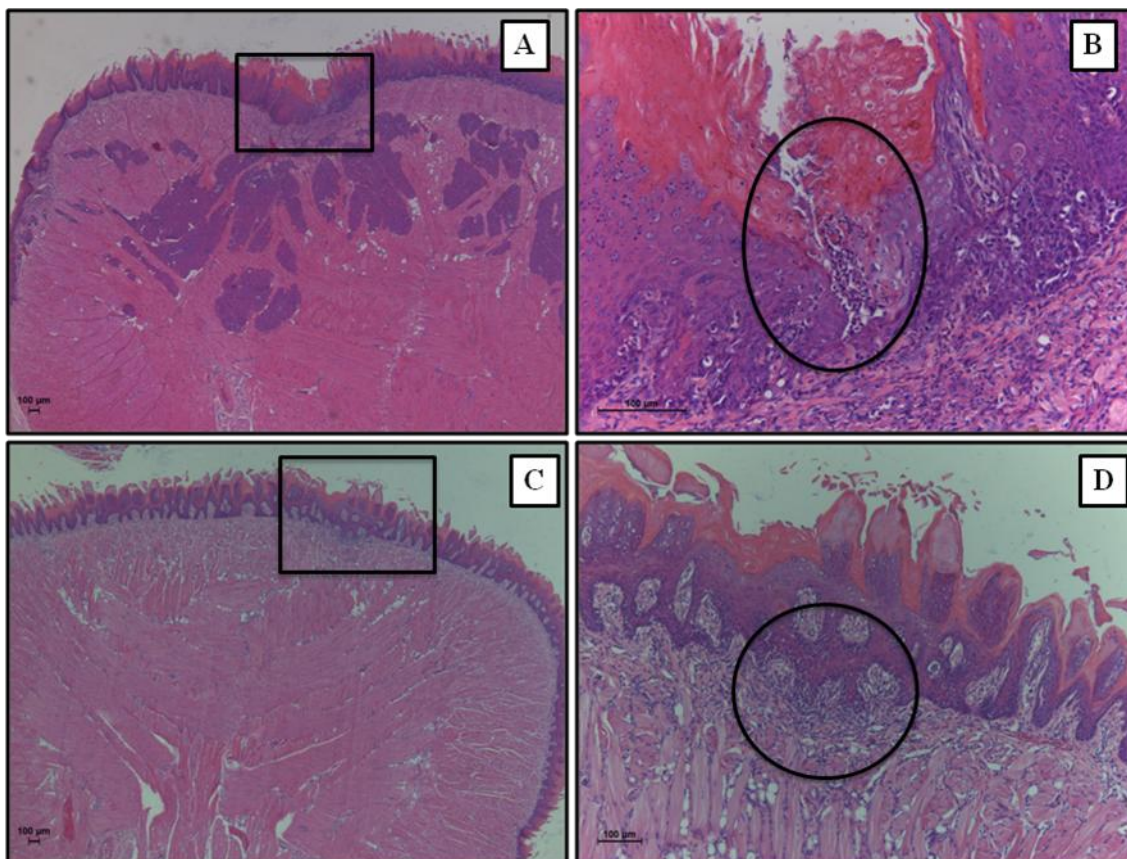
Podemos observar que em relação à espongiose apenas o grupo controle positivo e nitensidina A nas doses de 10 mg/kg p.c. e 50 mg/kg p.c. apresentaram pequenas áreas com essa alteração inflamatória, mas que não foram diferente estatisticamente.

As três doses de nitensididina A, demonstraram presença de reação liquenóide com maior prevalência no grupo tratado com nitensidina A na dose 2 mg/kg p.c. apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo controle normal. A alteração inflamatória encontrada nos animais pertencentes ao grupo tratado com o alcalóide nitensidina A na menor dose (2mg/kg p.c.) por estar relacionada com a diminuição do número de carcinomas encontrados também nesse grupo, ou seja, uma vez que a ulceração da superfície permite o desenvolvimento de processos infecciosos

que são combatidos pelo sistema imunológico ou mesmo pela presença de maior resposta inflamatória associada a tumores malignos.

Nos últimos anos, estudos vem demonstrando que a resposta imune normal do corpo ajuda na proteção contra câncer. Células tumorais variantes com uma exposição reduzida ao ataque imune podem derrotar a vigilância imunológica, e o processo da progressão tumoral ao que se pensa inclui mudanças herdáveis que reduzem a antigenicidade do tumor, sendo assim, oncologistas estão aprendendo a manipular a resposta imune para intensificar o ataque em tumores específicos, permitindo que as células tumorais possam ser eliminadas como se fossem tecido estranho (ALBERTS, 2010). A presença de infiltrado inflamatório é controversa, mas associa-se a melhor prognóstico (inflamação combatendo o cec), por vezes o tumor libera fatores que atraem células de defesa que auxiliam o tumor em aspectos como a invasão ou a produção de novos vasos que o sustentam, dessa maneira estudos mais aprofundados podem ser realizados para confirmar a suposição de que a dose de 2 mg/kg p.c. de nitensidina A teve influencia na redução do numero de carcinoma encontrado em nosso estudo.

A figura 40 demonstra imagens histológicas de regiões com espongiose e reação liquenóide.

Figura 40: Espongiose e Reação Liquenóide.

Legenda: Língua (Hematoxilina & Eosina). Grupo tratado com 10 mg/kg p.c. de nitensidina A (A e B); grupo controle positivo (C e D). A) região onde verificamos a presença de espongiose (2,5x) em detalhe em B; B) Espongiose (10x). C) região onde verificamos a presença de região liquenóide (2,5x), detalhe na fotomicrografia D; D) Região Liquenóide (10x).

O 4NQO é considerado um potente agente mutágeno e carcinogênico, demonstrado por diversos estudos, onde há indução de carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, fibrossarcomas, linfomas e papilomas, em cobaias, coelhos, hamsters e ratos, assim como lesões neoplásicas na cavidade oral (ENDO & SUGIMURA, 1971; TANAKA, 1995), ainda o 4NQO possui atividade mutagênica em *salmonella typhimurium* (MCCANN et al., 1975). Em nosso trabalho, conseguimos induzir a carcinogênese através da exposição ao óxido de 4-Nitroquinolina (4NQO) de maneira eficaz em todos os grupos expostos a este carcinógeno, resultados semelhantes foram obtidos por Grawish e colaboradores (2011), que utilizaram 20 ppm de 4NQO por 8 semanas e Mehdipour e colaboradores com a utilização 30 ppm de 4NQO por 12 semanas. Estudos relatados por Ribeiro e colaboradores (2014), Jesus e colaboradores (2014) e Ribeiro e colaboradores (2015) verificaram os estágios de carcinogênese

lingual na fase de iniciação (1^a-4^a semana) e promoção (5^a-8^a semana) com a exposição dos animais por 20ppm de 4NQO durante 8 semanas, demonstrando assim semelhança com nossos resultados nos quais os animais foram expostos a dosagem de 25 ppm por 8 semanas consecutivas.

Quando avaliamos as análises macroscópicas, a menor dose testada do alcalóide guanidínico nitensidina A (2 mg/kg p.c.) nos chamou a atenção, pois em relação ao número de lesões e especificamente ao aparecimento das placas brancas (lesões mais frequentes), notamos que quando comparadas com as maiores doses administradas houve diminuição, sendo diferente estatisticamente do grupo controle positivo (placas brancas). A menor dose administrada via intraperitoneal nos animais (2 mg/kg p.c.), não demonstrou ulceração e presença de pápula. O número de nódulos encontrados também apresentou diminuição estatística significativa, quando comparados ao grupo controle positivo.

Os dados microscópicos corroboraram com as análises macroscópicas. A dose de 2 mg/kg p.c. de nitensidina A novamente demonstrou um efeito expressivo, pois apresentou redução estatística significativa em comparação ao grupo controle positivo na porcentagem de displasia analisada. Além disso, esta concentração de nitensidina A também foi capaz de reduzir a porcentagem de carcinomas micro-invasivos em relação ao grupo controle positivo (com diferença estatística significativa). Do mesmo modo, observamos redução, estatística significativa, da porcentagem de tumores malignos que apresentaram invasão muscular quando comparamos com o grupo controle positivo. Esta menor capacidade de invasão também pode ser observada quando comparamos a presença de invasão de tecido adiposo e glandular onde nenhum animal tratado com nitensidina A (2 mg/kg p.c.) apresentou este tipo de invasão.

Os tratamentos com nitensidina A, nas concentrações de 10 e 50 mg/kg p.c. aumentaram o número de CECs (micro-invasivos e invasivos somados), em comparação ao grupo controle positivo e a menor dose administrada. Também propiciaram maior presença de processos invasivos quando comparadas ao grupo controle positivo, a dose de 10 mg/kg p.c. apresentou invasão muscular e glândular, e a maior dose teve maior porcentagem de invasão muscular, aproximadamente 10% a mais que dose de 2 mg/kg p.c.

Devemos levar em consideração que nosso estudo analisou o efeito sistêmico da nitensidina A sobre o desenvolvimento dos tumores malignos (tratamento

intraperitoneal), diferentemente do estudo anterior realizado por Sorbo e colaboradores (2011), onde foi analisado o efeito direto do composto nitensidina A sobre o tumor maligno (tratamento intratumoral), mas que, assim como em nosso estudo, nitensidina A também apresentou resultados significativos na redução tumoral.

Por fim, quando analisamos os dados macroscópicos e microscópicos em nosso estudo, podemos sugerir que o alcalóide guanidínico nitensidina A no modelo de indução da carcinogênese através do 4NQO, foi capaz de interferir no processo de oncogênese tumoral (promoção), na menor dose testada (2 mg/kg p.c.), pois demonstrou resultados promissores para futuras investigações desse composto como um possível agente antitumoral.

Sendo assim, podemos concluir que o aumento de apoptose/necrose observado em cultura de células pode ter influenciado no desenvolvimento dos CECs na menor dose testada *in vivo*. Mas este efeito parece ter se dissipado quando as concentrações foram aumentadas. Por outro lado, a maior presença de resposta liquenóide no grupo nitensidina A (2 mg/kg p.c.) denota maior resposta celular ao tecido epitelial, fator que pode ter influenciado no combate às lesões malignas. Estudos mais aprofundados deverão ser realizados para avaliar a possível atividade de nitensidina A frente a processos inflamatórios.

4.2.4. Avaliação do Índice Mitótico

A fração de crescimento ou capacidade proliferativa é importante na evolução do câncer. O índice mitótico é um importante componente de todos os sistemas de estadiamento histológico. A tabela 5 relaciona-se a porcentagem de índice mitótico de carcinoma *in situ*, micro invasivo e invasivo.

Tabela 5: Avaliação do Índice Mitótico

	Carcinoma In Situ	Carcinoma Micro Invasivo	Carcinoma Invasivo
G I - Normal	0	0	0
G II - CP	0	2	1.045
G III - 2 mg/kg p.c.	0	2.5	2.83
G IV - 10 mg/kg p.c.	0	2.87	4
G V - 50 mg/kg p.c.	0	1.165	2.66
G VI - Cont. Nit. A	0	0	0

Legenda: As análises do índice mitótico foram realizadas nos grupos controles e nos tratamentos com o composto nitensidina A.

O grupo controle positivo demonstrou índice mitótico de 1,0 (média em 10 campos de 40x) nos carcinomas invasivos. Os grupos tratados com o composto nitensidina A apresentaram valores 2,83; 4,0 e 2.66, respectivamente para 2 mg/kg p.c., 10 mg/kg p.c. e 50 mg/kg p.c. O índice mitótico do carcinoma micro invasivo foi observado também nos tratamentos com o composto nitensidina A e no grupo controle positivo.

Segundo Bernardi e colaboradores (2009) a diminuição do índice mitótico e outras características histológicas conferem ao tumor aspectos menos invasivos e proliferativos, em nosso estudo não houve diminuição do índice mitótico em nenhuma das concentrações tratadas com o alcalóide nitensidina A, quando comparadas ao controle 4NQO, corroborando assim com as características de invasão demonstradas anteriormente.

O índice mitótico foi calculado pela média de número de mitoses em dez campos distintos (40 x) na área mais proliferativa e é correlacionado com a velocidade de proliferação celular (POPIOLEK et al., 2004). Não foi possível realizar a análise estatística, pois o índice mitótico é realizado apenas nos animais que apresentaram carcinoma.

A razão necrose/tumor foi analisada pela presença ou ausência de área necrótica. Nos resultados avaliados, não houve nenhuma área de necrose.

Dessa maneira, podemos sugerir que nitensidina A não alterou o índice mitótico intra-tumoral nos tumores induzidos por 4NQO.

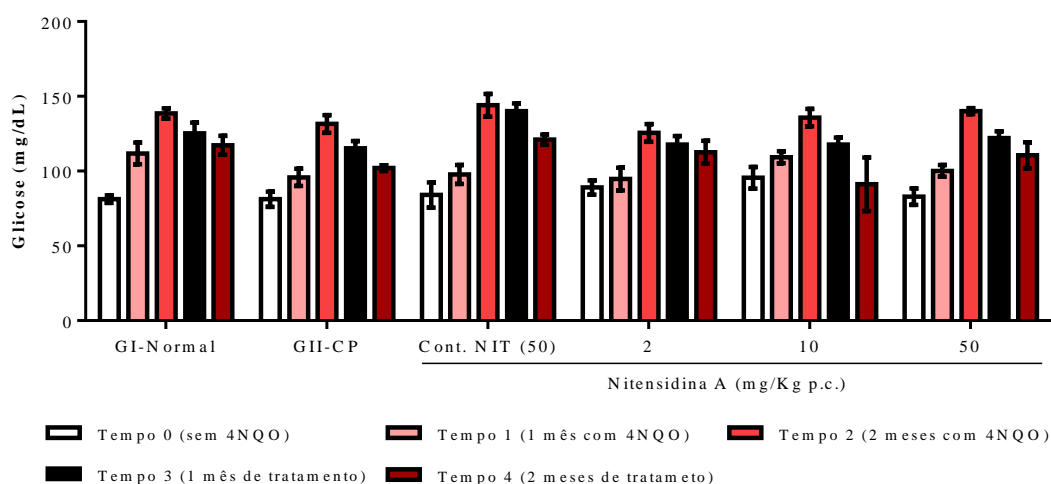
4.2.5. Parâmetros Bioquímicos

4.2.5.1. Glicemia

A concentração de glicemia (figura 41) presente no sangue dos animais foi determinada pelo método da glicose-oxidase (TRINDER, 1969):

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e H₂O₂. O H₂O₂ formado reage com 4-aminoantipirina, sob ação catalisadora da peroxidase formando uma antipirilquinonimina (vermelha), com absorção em 505 nm proporcionalmente à concentração da glicose na amostra.

Figura 41: Glicemia (mg/dL)



Legenda: Glicemia (mg/dL) dos ratos tratados (2, 10 e 50 mg/kg p.c.) com o composto nitensidina A, e não tratados (normal e veículo). Resultados estão expressos como a média e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos vs grupo controle positivo – CP (4NQO+DMSO 1%).

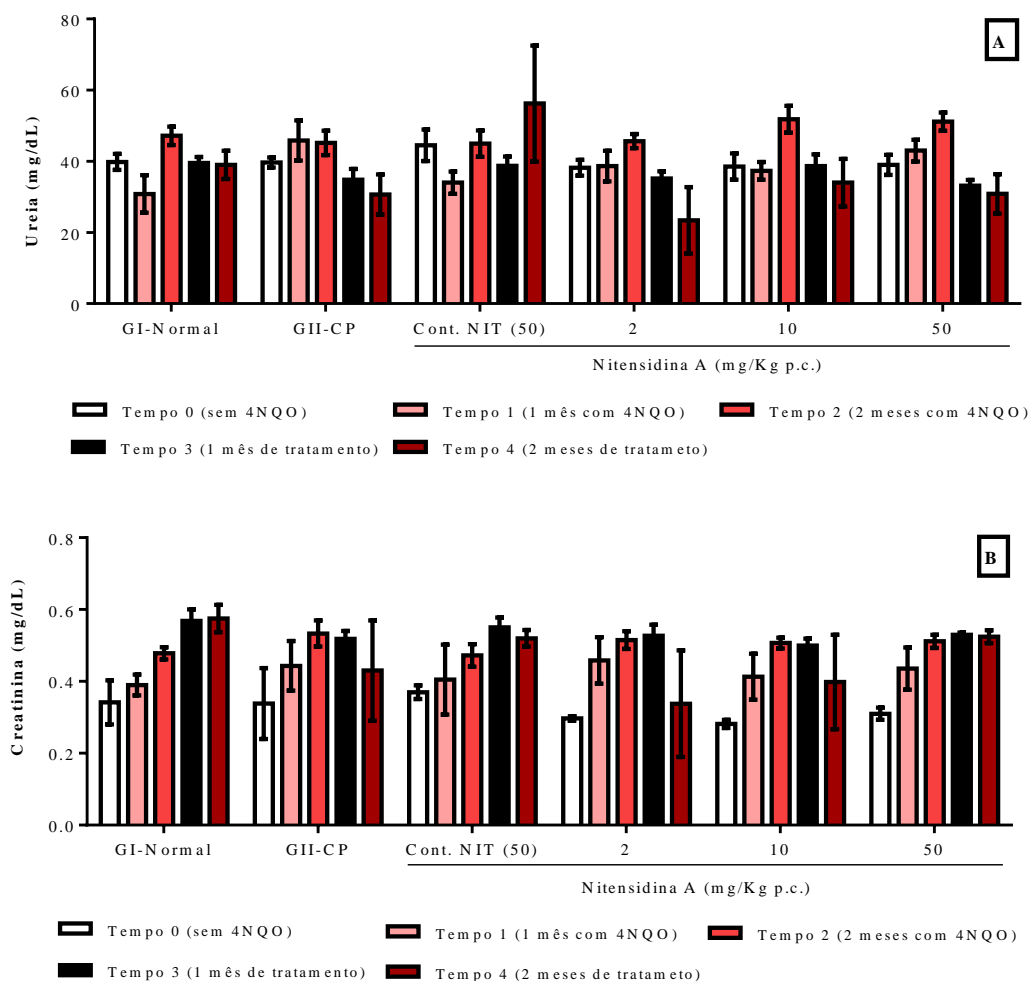
O valor de glicemia dos animais, demonstrou uma tendência em aumentar nos tempos 0 e 2 (até 2 meses de exposição ao 4NQO). Nos tempos 3 e 4 (tratamento com o composto) houve uma tendência contrária (queda no valor glicêmico) desses animais, porém não houve diferença estatística. Esses dados foram observados em todos os grupos experimentais, portanto, nem o composto carcinogênico, nem o composto estudado nitensidina A, demonstraram efeito sobre os níveis glicêmicos dos animais, e estas variações podem ser atribuídas a variações intrínsecas à espécie de estudo.

4.2.5.2. Toxicidade Renal – Uréia e Creatinina

A hidrólise da ureia catalisada pela urease produz íons amônio e CO_2 . Os íons amônio reagem com salicilato e hipoclorito de sódio em meio alcalino na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, formando o azul de indofenol, o qual é monitorado espectrofotometricamente em 600 nm.

Foi observado (figura 42A) que houve uma leve diminuição dos níveis de ureia nos grupos tratados com o composto nitensidina A após o término da exposição dos animais ao 4NQO, permanecendo até o final do tratamento. Essa diminuição também se mantém no grupo controle positivo, porém não houve nenhuma diferença estatística.

A creatinina é o produto da degradação da fosfocreatina no músculo. Através da determinação (concentração) de creatinina no sangue podemos avaliar a capacidade da função renal. Quando os níveis de creatinina foram analisados (figura 42B) foi observado que os animais do grupo normal tiveram seus níveis de creatinina crescentes após os tempos analisados. Os grupos tratados com o alcalóide nitensidina A, nas menores concentrações (2 e 10 mg/kg p.c.), apesar de não apresentar diferença estatística, demonstraram uma tendência na redução dos níveis de creatinina a partir do primeiro mês de tratamento.

Figura 42: Ureia e Creatinina

Legenda: Ureia (A) e creatinina (B) dos ratos tratados (2, 10 e 50 mg/kg p.c.) com o composto nitensidina A, e não tratados (normal e veículo). Resultados estão expressos como a média e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos *vs* grupo controle positivo – CP (4NQO+DMSO 1%).

4.2.5.3. Toxicidade Hepática – AST/ALT/ALP

A atividade da Aspartato aminotransferase (AST), foi verificada por meio do método cinético na região ultravioleta do espectro (BERGMEYER, 1977). A AST catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o alfa-cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxaloacetato é reduzido à malato sob ação catalisadora da malato desidrogenase (MDH), ao mesmo tempo em que a coenzima NADH é oxidada à NAD⁺. Ocorrendo a diminuição da absorvância em 340 nm, a qual é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. A figura 43A demonstra a

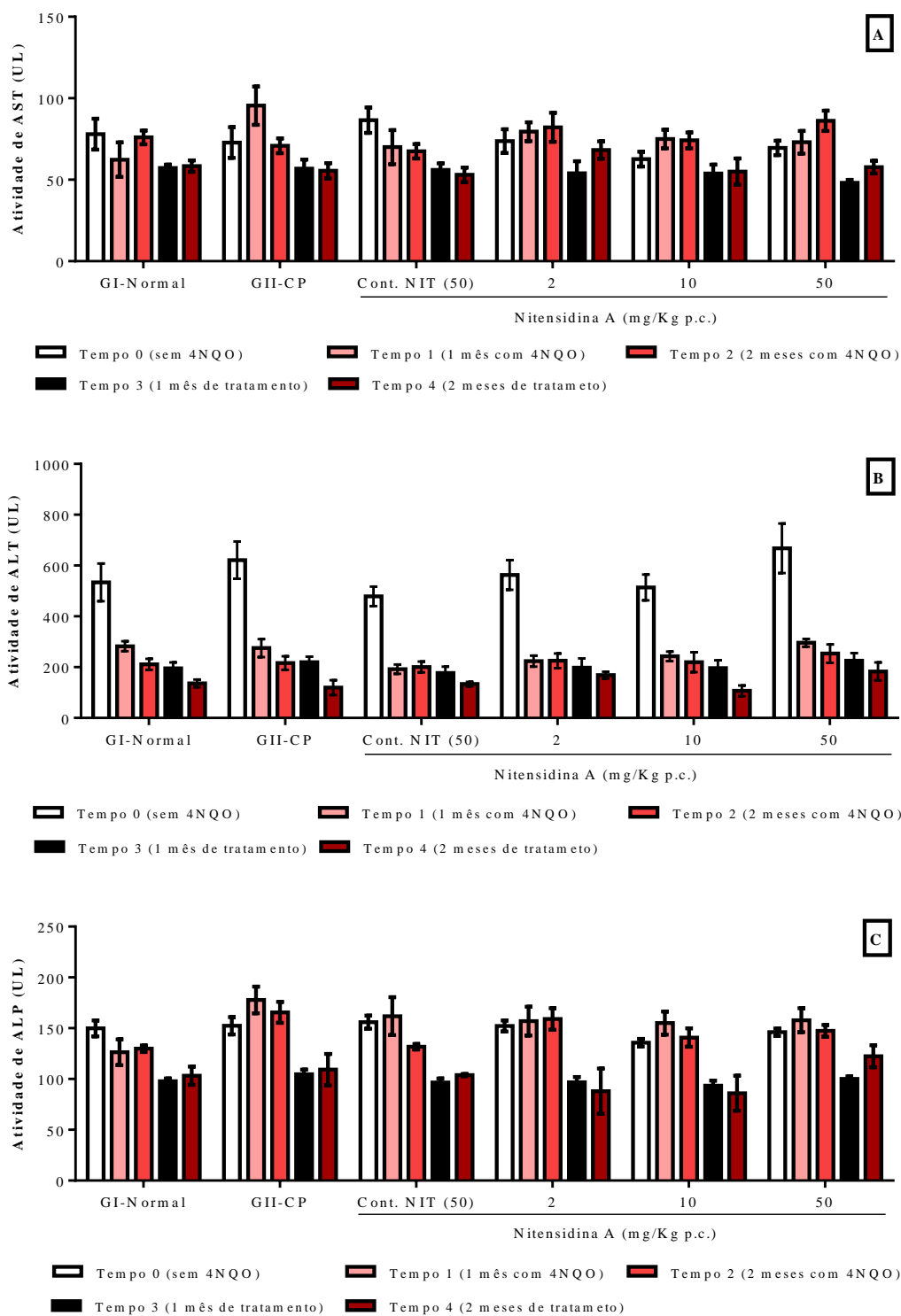
atividade da AST, onde nota-se ligeira queda nos níveis dos animais pertencentes ao grupo controle positivo.

A atividade da enzima Alanina aminotransferase (ALT), foi determinada pelo método cinético UV (WRÓBLENSKI & LADUE, 1956), onde a ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o alfa-cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato sob ação catalisadora da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A diminuição da absorvância em 340 nm, em função do tempo, devido à oxidação da NADH, é diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. Na figura 43B foi possível observar claramente que, em todos os grupos no tempo 0, a atividade da ALT estava mais elevada, e que nos tempos seguintes essa atividade caiu também para todos os grupos.

A atividade da Fosfatase alcalina (ALP) foi demonstrada pelo método colorimétrico (SCANDINAVIAN, 1974), onde a fosfatase alcalina do soro, em meio alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade de p-nitrofenol produzida é monitorada em 405 nm e é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra. Os resultados da atividade da ALP estão demonstrados na figura 43C, onde observa-se que as menores concentrações do composto nitensidina A (2 e 10 mg/kg p.c.) houve uma diminuição da atividade após o início do tratamento.

Em nenhuma das enzimas analisadas, AST, ALT e ALP foi observado diferença estatística significativa.

Figura 43: Atividade das enzimas AST/ALT/ALP



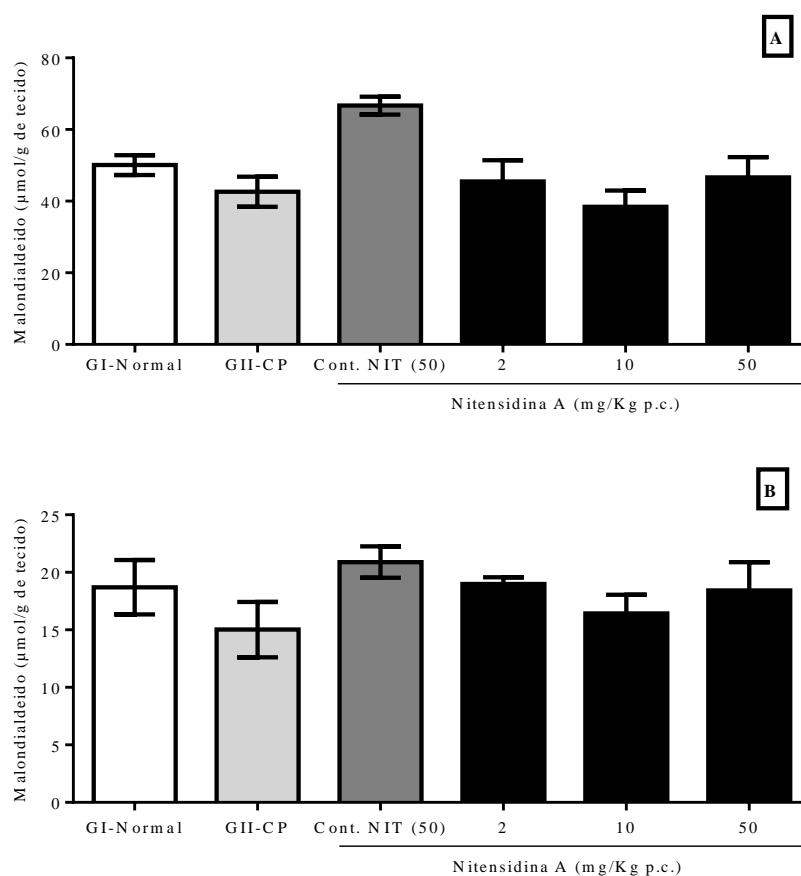
Legenda: Atividade das enzimas dos ratos tratados (2, 10 e 50 mg/kg p.c.) com o composto nitensidina A, e não tratados (normal e veículo). A) AST (UL); B) ALT (UL) e C) ALP (UL). Resultados estão expressos como a média e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos vs grupo controle positivo – CP (4NQO+DMSO 1%).

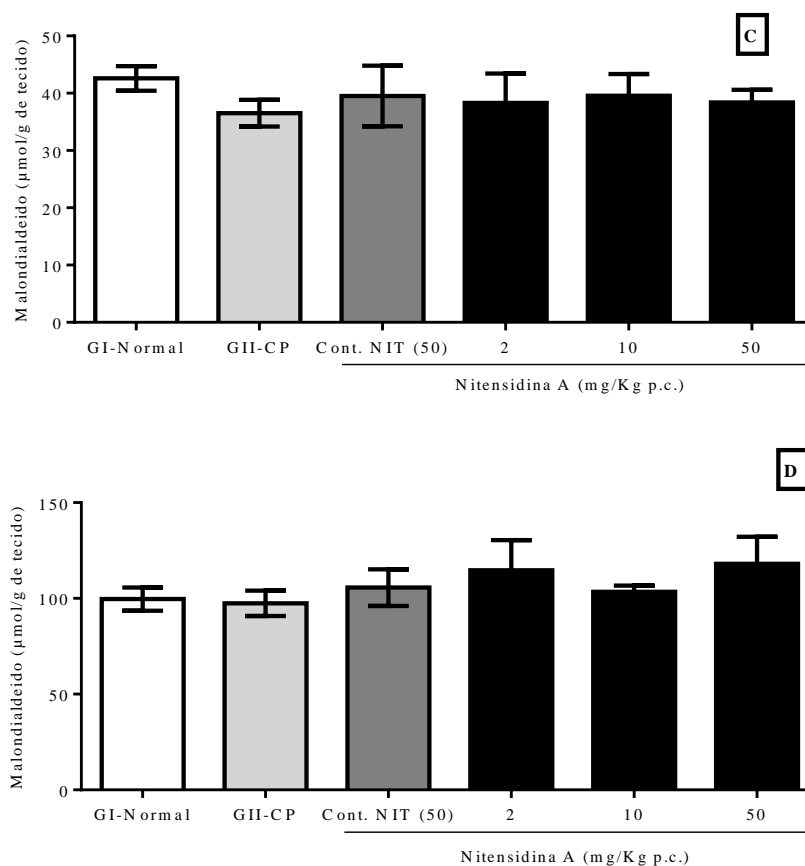
4.2.5.4. Níveis de malondialdeído (MDA) – Fígado/Estômago/Rim/Coração e Plasma

O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), determinando assim biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo. O MDA no fígado, estômago, rim e coração foi determinado espectrofotometricamente em 535 nm e a concentração de MDA no plasma foi determinada fluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente.

Os resultados estão expressos nas figuras 44 e 45, onde se demonstra as concentrações de MDA nos órgãos e no plasma dos animais, respectivamente. Foi observado que, em nenhum órgão analisado e no plasma, houve diferença significativa entres os grupos de animais, não evidenciando nenhuma alteração relacionada ao estresse oxidativo.

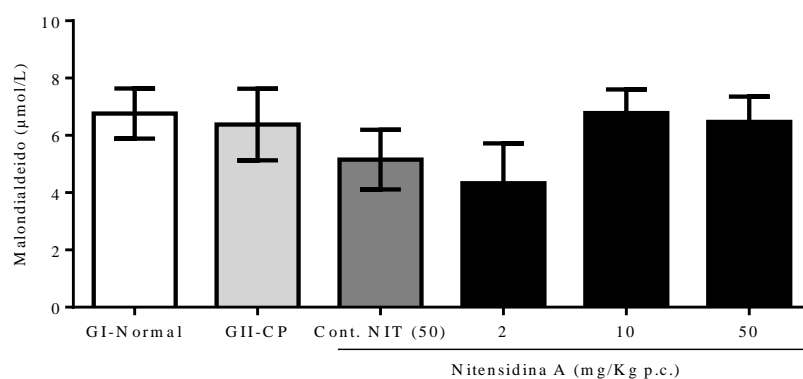
Figura 44: Concentração de MDA nos órgãos ($\mu\text{mol/g}$ de tecido)





Legenda: Concentração de MDA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado (A); estômago (B); rim (C) e coração (D) dos ratos tratados (2, 10 e 50 mg/kg p.c.) com o composto nitensidina A, e não tratados (normal, veículo e grupo 4NQO). Os resultados estão expressos como a média e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos vs grupo controle positivo – CP (4NQO+DMSO 1%).

Figura 45: Concentração de MDA plasmático



Legenda: Concentração de MDA plasmático dos ratos tratados (2, 10 e 50 mg/kg p.c.) com o composto nitensidina A, e não tratados (normal, veículo e grupo 4NQO). Os resultados estão expressos como a média e erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os grupos vs grupo controle positivo – CP (4NQO+DMSO 1%).

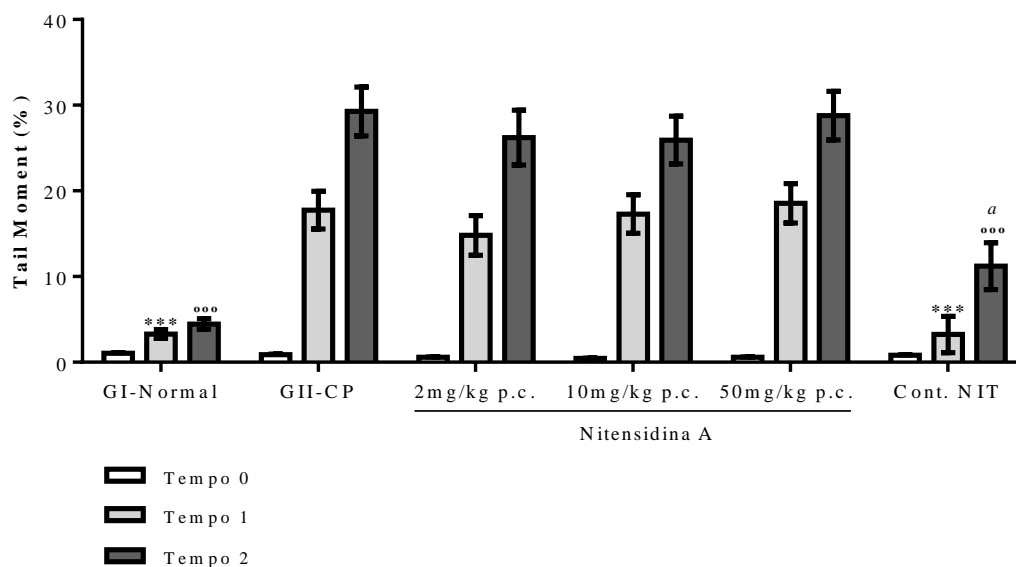
Óxido de 4-Nitroquinolina (4NQO) é um poderoso carcinógeno químico cuja ação cancerígena inicia-se pela redução enzimática do seu grupo nitro.4-Nitroquinolina 1-óxido (KITANO, 2000; NAGÃO & SUGIMURA 1976).

Estudos realizados por Viswanadha e colaboradores (2011) foram realizados para avaliar a hepatotoxicidade e toxicidade renal em animais expostos ao 4NQO (20 ppm por 8 semanas) tratados com Spirulina, e observaram o efeito protetor de Spirulina contra o fígado e danos nos rins causados pela possível toxicidade acarretada pelo 4NQO. Esses dados foram antagônicos aos dados encontrados em nosso experimento, onde não observamos nenhuma alteração significativa entres os grupos avaliados.

Entretanto, podemos sugerir que o alcalóide guanidínico nitensidina A não demonstrou toxicidade hepática e renal, e ainda não alterou os padrões dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo nos órgãos (fígado, estômago, rim e coração) e plasma dos animais avaliados, visto que o grupo de animais sem exposição ao 4NQO e tratados com nitensidina A por 8 semanas (50 mg/kgp.c.) via intraperitoneal (Cont. NIT), não demonstrou diferença estatística quando comparados aos animais do grupo normal (animais sem 4NQO e sem nitensidina A), mantendo o mesmo perfil em todos os parâmetros avaliados.

4.2.6. Ensaio do Cometa

Em relação à análise da genotoxicidade, foram avaliados danos causados no DNA das células sanguíneas dos animais expostos ao 4NQO (controles e tratados com nitensidina A) e animais sem exposição ao agente carcinógeno (normal e controle nitensidina A), antes (tempo 0), durante (tempo 1 – 1 mês de exposição ao 4NQO) e depois (tempo 2 – 1 mês de tratamento com o alcalóide) da realização dos experimentos. As porcentagens de danos ao DNA foram avaliadas pelo *Tail Moment* e os resultados estão descritos na figura 46.

Figura 46: Ensaio do Cometa

Legenda: Avaliação da genotoxicidade por meio da porcentagem de *Tail Moment*. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com pós test de Dunn's (todos os grupos vs grupo controle positivo (CP) – 4NQO+DMSO 1%); tempo 1: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; tempo 2: ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$; GI-Normal vs Cont. NIT (tempo 2): a $p \leq 0,05$ aa $p \leq 0,01$ aaa $p \leq 0,001$.

Observamos em nosso estudo que não houve genotoxicidade no tempo 0. Quando analisamos o tempo 1, animais que foram expostos ao agente carcinogênico 4NQO durante um mês, e o tempo 2, animais que foram expostos ao 4NQO por dois meses e tratados com nitensidina A durante 1 mês, notamos que houve genotoxicidade tempo resposta em todos os grupos, exceto o grupo normal. Dessa maneira aludimos que o composto testado nitensidina A mostrou-se genotóxico nos dois tempos avaliados, assim como o grupo controle positivo. Esses resultados corroboram com os dados analisados por Sorbo e colaboradores (2011), visto que no modelo xenográfico de indução tumoral em camundongos *nude* Balb/c, tratados com nitensidina A também houve genotoxicidade nos grupos estudados.

Vale salientar que o grupo controle nitensidina A, embora tenha apresentado perfil genotóxico no tempo 2 (11,2 \pm 2,7), demonstrou que houve diminuição significativa nos dois tempos analisados quando comparados ao grupo controle positivo (tempo 1: 17,7 \pm 2,2 e tempo 2: 29,2 \pm 2,8). O grupo controle nitensidina A (50 mg/kg p.c.) não foi exposto ao agente carcinogênico 4NQO, assim como o grupo normal, porém demonstrou diferença estatística significativa no tempo 2, aumento de genotoxicidade (GI-Normal x Cont NIT).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o alcalóide nitensidina A apresentou genotoxicidade em células de câncer cervical imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C-33A). Dessa maneira, os dados *in vitro* corroboram também com os dados obtidos quando avaliamos o tratamento com nitensidina A no modelo de indução da carcinogênese por 4NQO, demonstrando perfil genotóxico desse composto.

De fato, essa relação entre a genotoxicidade de um determinado composto, pode ser abordada de uma maneira positiva, visto que esse dano no DNA pode induzir a célula à morte, ou até mesmo, visto que danos observados através do ensaio do cometa, como em nosso estudo, podem ainda ser reparados por uma maquinaria específica responsável por esses processos. Diversos estudos vêm sendo conduzidos para a utilização de fármacos que tenham como mecanismo de ação a ligação ao DNA ou que se intercalem seletivamente neste, induzindo sinais intracelulares que levam as células tumorais à morte por apoptose (HAVELKA et al., 2007; WHEATE et al., 2007). A vincristina e a camptotecina são alcalóides naturais, que vem sendo utilizados na Oncologia por interferir na desorganização de microtúbulos e inibir a topoisomerase I, respectivamente (COSTA et al., 2008; SIRIKANTARAMAS et al., 2007).

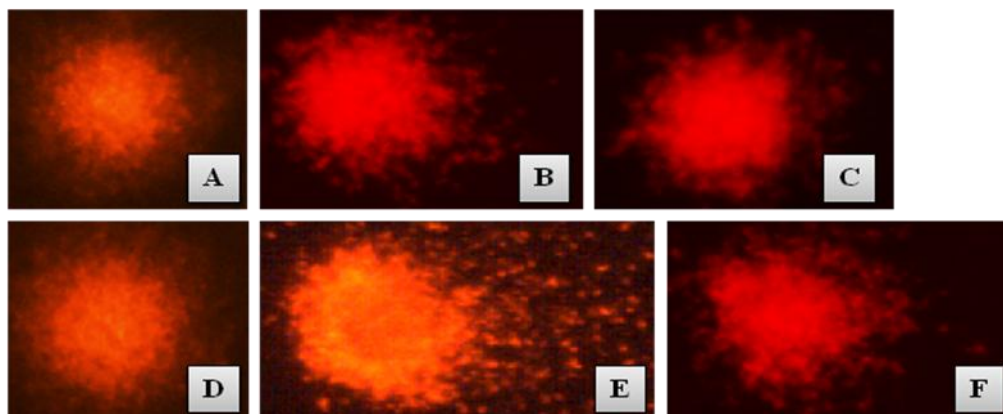
Estudos na literatura indicam que diferentes metabólitos secundários, tais como flavonóides e alcalóides, amplamente utilizados nos últimos tempos, podem ser potencialmente genotóxicos (SCHMITTA et al., 2003). Os mecanismos envolvidos que explicam a clastogenicidade e/ou interação com o DNA não estão totalmente elucidados. A segurança ou toxicidade da utilização destes compostos estão relacionados ao tempo de exposição e à dose utilizada administrada (SCHMITTA et al., 2003). O dano ao DNA, tanto por agentes químicos como físicos, pode ser avaliado em vários tipos celulares por meio de análises citogenéticas (aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, formação de micronúcleo) e bioquímicas (teste do cometa). Para a avaliação dos níveis de dano no DNA, existem algumas técnicas disponíveis. A eletroforese de células isoladas (teste do cometa), por exemplo, de células epiteliais humanas, nos permite avaliar o índice de danos no DNA.

Os cometas podem ser classificados por imagem computacional em diversas categorias, com base no comprimento de migração e na proporção relativa de DNA na cauda, atribuindo-se características a cada classe de migração. O dano ao DNA, no ensaio do cometa pode ser induzido por drogas, radiações e substâncias inorgânicas. A

exposição do DNA ao estresse oxidativo leva a mais de 20 diferentes tipos de dano (produzindo bases nitrogenadas oxidadas) (COSTA et al., 2001). O dano mais comum às purinas é a formação do produto oxidado 8-oxo-dG, o qual é usado para avaliação de ensaios ao DNA (BARZILAI & YAMAMOTO 2004).

O Óxido de Nitroquinolina (4NQO) é uma quinolina derivada que reage com peróxido de hidrogênio incorporado a um radical nitro, e a redução enzimática desse grupo nitro juntamente com a formação de um composto intermediário, o 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO) pode estar relacionada aos seus efeitos carcinogênicos (HENRIQUES et al., 2011). Ocorre a indução de estresse oxidativo intracelular com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pelo 4HAQO (KANOJIA & VAIDYA, 2006), como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, que podem ser os responsáveis pela indução de mutações em bases nitrogenadas do DNA, por aberrações cromossômicas e também por quebras e/ou trocas de cromatina (TANAKA, 2002). O 4NQO pode induzir lesões no DNA normalmente corrigidas pelo reparo de excisão de nucleotídeos, pode ainda induzir o estresse oxidativo intracelular resultante de mutações (rupturas da cadeia do DNA), esses efeitos são semelhantes às alterações genéticas induzidas pelo tabaco, tornado assim possível à correlação entre 4NQO e tabaco (VITALE-CROSS et al., 2009). O 4NQO pertence à classe dos compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Os HPA encontram-se presentes em uma classe de compostos que apresentam grande potencial carcinogênico, sendo promotores de tumores (ROJAS et al., 1999), manifestando-se geralmente através da formação de adutos de DNA, que se não reparados resultam em mutações permanentes, iniciando assim o processo de formação da carcinogênese. Seus efeitos carcinogênicos podem estar relacionados à redução enzimática do grupo nitro presente em um dos anéis aromáticos, formando o composto 4-HAQO, interagindo por sua vez com os resíduos de guanina do DNA, havendo a substituição por uma pirimidina, causando danos no material genético (FARIA, 2006), e sendo assim considerado um agente mutagênico e genotóxico (VISWANADHA, 2011), corroborando dessa maneira com nossos resultados, onde observamos que todos os grupos expostos ao 4NQO demonstraram perfil genotóxico.

A figura 47 demonstra a medida de fragmentação do DNA na cauda distante do nucleóide.

Figura 47: Células do cometa

Legenda: Ensaio do cometa demonstrando os níveis de dano ao DNA na cauda. Tempo 1 - A) GI – Grupo Normal; B) G II – Controle Positivo; C) IV – Tratamento nitensidina A-2 mg/kg p.c. Tempo 2 – D) GI – Grupo Normal; E) G II – Controle Positivo; F) IV – Tratamento nitensidina A-2 mg/kg p.c.;

De acordo com Ferreira et al (2009), frações de *P. nitens* demonstraram efeito genotóxico e mutagênico *in vitro*, *Trandescantia pallida*, podendo essas características serem atribuídas a presença de alcalóides guanidino-terpênicos pteroginina, pteroginidina e nitensidina A entre outros metabólitos potencialmente ativos.

Nos experimentos *in vivo*, nitensidina A demonstrou redução tumoral no modelo de indução da carcinogênese por 4NQO na menor dose testada (2 mg/kgp.c.). Nitensidina A não demonstra alterações nos níveis de glicemia, toxicidade renal e hepática e ainda nos padrões de oxidação nos órgãos e plasma analisados por meio do ensaio de TBARS. Além disso, demonstrou perfil genotóxico, ou seja, dano no DNA passível de ser reparado.

Dessa maneira, podemos concluir que o alcalóide guanidínico nitensidina A, apresentou resultados relevantes nos experimentos *in vitro*, e também nos experimentos *in vivo*, podendo sugerir estudos mais aprofundados para este modelo de indução da carcinogênese por 4NQO, na menor dose testada, para validar assim, seu possível efeito antitumoral contra carcinoma epidermóide de boca.

5. CONCLUSÕES:

Por meio da análise dos resultados obtidos em nosso estudo *in vitro*, podemos sugerir que para as linhagens HSC-3 e HaCat, tratadas com o alcalóide guanidínico nitensidina A, extraído de *Pterogyne nitens*:

- Houve citotoxicidade, em 24 horas de tratamento por meio do ensaio de SRB;
- Nos experimentos Anexina V e exclusão por fluorocromos, a morte celular ocasionada demonstrou ser morte mista (apoptose precoce, tardia e necrose) nos dois tempos de tratamento (12 e 24 horas);
- A morte celular analisada pelo método do “TUNEL” demonstrou ser por apoptose em 24 horas de tratamento;
- Não houve ativação da caspase-3 em nenhuma concentração testada (24 horas), sugerindo, portanto, morte por apoptose independente de caspase;
- Nitensidina A demonstrou perfil mutagênico através do teste do micronúcleo em 24 horas de tratamento;
- Não houve aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Os ensaios de western blot sugerem que nitensidina A pode estar relacionada com a via PI3K/AKT e que não promove ativação de caspase-3.

Por meio da análise dos resultados obtidos *in vivo*, podemos sugerir que:

- O modelo de indução por 4NQO foi efetivo, porém o tratamento realizado nos animais com o composto nitensidina A demonstrou redução no processo de carcinogênese, na menor dose testada (2mg/kg p.c.).
- Nosso estudo demonstrou que no modelo de indução por 4NQO, tratados com nitensidina A, houve invasão dos tumores, não houve a diminuição do índice mitótico e não obtivemos áreas em necrose;
- Os parâmetros bioquímicos: Glicemia, Ureia, Creatinina; as enzimas hepáticas (AST, ALT e ALP), os níveis de MDA nos órgãos e no plasma dos animais não demonstraram nenhuma diferença estatística, sugerindo que o composto

nitensidina A pode apresentar atividade local e não sistêmica nos grupos tratados para análise desses parâmetros.

- O composto nitensidina A apresenta perfil genotóxico demonstrado no ensaio do cometa.

REFERÊNCIAS

A.C. CAMARGO CANCER CENTER. Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa. **Tudo sobre câncer**. [Internet]. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer>.

AI, L.; STEPHENSON, K.K.; LING, W.; ZUO, C.; MUKUNYADZI, P.; SUEN, J.Y.; HANNA, E.; FAN, C.Y. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor- suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. **Mod Pathol**, v. 16, p. 944-950, 2003.

ALBERTS B.; JOHNNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Porto alegre: Artmed, 2010.

AMARAVADI, R.K.; THOMPSON, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clin Cancer Res.**,v. 13, n. 24, p. 7271-9, 2007.

AYAZ B.; SALEEM, K.; AZIM W.; SHAIK, A. A clínico-pathological study of oral cancers. **Biomedica**, v. 27, p. 29–32, 2011.

BAGAN J.; SARRION, G.; JIMENES, Y. Review Oral cancer: Clíical features. **Oral Oncology**, v. 46, p. 414–417, 2010.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. Review: DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v.3, n. 8-9, p.1109-1115, 2004.

BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie, 1977. v.9, p.449-453.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v.281, p.53–63, 2009.

BLAGOSKLONNY, M.V. Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. **Cell death and differentiation**. v.12, p.592–602, 2005.

BLAGOSKLONNY, M.V. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. **Leukemia**.v.20, p.385–391, 2006.

BLOT, W.J.; et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 48, p.3282-7, 1988.

BLUME-JENSEN P., HUNTER T. Oncogenic kinase signaling. **Nature**; v. 411, p. 355-365, 2001.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A.; KINGSTON, D. G. I. **J Nat Prod.**, v.11, p.1683-1688, 1995.

BOLLET, W.T.; BUSHMAN, C.J.; TIDWELL, P.T. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. **Anal Chem**. v.33, p.592-594, 1961.

BOROUGHES L.K.; DEBERARDINIS, R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature Cell Biol.**, v. 17, n. 4, p. 351-359, 2015.

BOTTONE, M. G.; SANTIN, G.; AREZIA, F.; BERNOCCHI, G.; PELLICCIARI, C.; SCOVASSI, A.; I.; Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An overview. **Cells**; v. 2, p. 294-305, 2013.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2612-2619, 2007

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, p. 231-239, 2005.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: patologia**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 149-93.

BRUIN, E.C.; MEDEMA, J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 8, p. 737-49, 2008.

BUNDELA S.; SHARMA A.; BISEN P.S. Potential Compounds for Oral Cancer Treatment: Resveratrol, Nimbolide, Lovastatin, Bortezomib, Vorinostat, Berberine, Pterostilbene, Deguelin, Andrographolide, and Colchicine. **PLoS One**, v. 10, n.11, 2015.

BUTLER, M.S., Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep.**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.

CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Rev /Cancer**. v.11, p. 572-583, p. 85-95, 2011.

CAPUANO A. C. T. **Estudos da expressão das proteínas PTEN e AKT em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão**. 2005. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, universidade de São Paulo, 2005.

CARRINGTON C. Oral targeted therapy for cancer. **Aust Prescr**, v. 38, n. 5, p. 171-176, 2015..

CARVALHO, P.E.R., Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

CASTELO, M.; PERFETTINI, J.L.; ROUMIER, T.; VALENT, A.; RASLOVA, H.; YAKUSHIJIN, K.; HORNE, D.; FEUNTEUN, J.; LENOIR, G.; MEDEMA, R.; VAINCHENKER, W.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. **Oncogene**, v. 23, n. 25, p. 4362-70, 2004.

CH'NG, S.; WALLIS, R.A.; YUAN L.; DAVIS, P.F.; TAN, S.T. Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern Pathol.**, v.19, p. 149-59, 2006.

CHU, Q.; AMANO, O.; KANDA, Y.; KUNII, S.; WANG, Q.; SAKAGAMI, H. Tumor specific cytotoxicity and type of cell death induced by Gefitinib in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Anticancer Res.**, v. 29, p. 5023-5032, 2009.

CIANCIO, G.; POLLACK, A.; TAUPIER, M.A.; BLOCK, N.L.; IRVIN, G.L. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. **J Histochem & Cytochem.**, v.36, n. 9, p.1147-52, 1988.

COLETTI, J.; BONDUELLE, G. M.; IWAKIRI, S. Avaliação de defeitos no processo de fabricação de lamelas para pisos de madeira engenheirados com uso de ferramentas de controle de qualidade. **Acta Amaz.**, v. 40, p. 135-140, 2010.

COOK, J.G.H. Creatinine assay in the presence of protein. **Clin Chim Acta.** v. 32, p. 485-486, 1971.

COLLISSON, E. A.; KLEER, C.; WU, M. et al. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. **Mol Cancer Ther.**, v.2, p.941-948, 2003.

COQUEIRO, A.; REGASINI, L.O.; STAPLETON, P.; BOLZANI, V.S.; GIBBONS, S. In Vitro Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens* and Synthetic Analogues. **J Nat Prod** . v. 77, p. 1972–1975, 2014.

COSTA, R.M.A.; LIMA, W.C.; VOGEL, C.I.G.; BERRA C.M.; LUCHE, D.D.; MEDINA-SILVA, R.; GALHARDO, R.S.; MENCK, C.F.M.; OLIVEIRA, V.R. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genet Mol Biol** , v.24, p.131-140, 2001.

COSTA, M. M.; HILLIOU, F.; DUARTE, P.; PEREIRA, L. G.; ALMEIDA, I.; LEECH, M.; MEMELINK, J.; BARCELO, A.R.; SOTTOMAYOR, M. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiol** , v.146, p.403-417, 2008.

CRIVOS, M.; MARTINEZ, M. R.; POCHETTINO, M.L.; REMORINI, C.; SY, A.; TEVES, L.J. Pathways as "signatures in landscape": towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guaraní (Northeastern Argentina). **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 3 p. 1-12, 2007.

CROWLEY-WEBER, C.L.; PAYNE, C.M.; GLEASON-GUZMAN, M.; WATTS, G.S.; FUTTSSCHER, B.; WALTMIRE, C.N.; CROWLEY, C.; DVORAKOVA, K.; BERNSTEIN, C.; CRAVEN, M.; GAREWAL, H.; BERNSTEIN, H. Development and molecular characterization of HTC-116 cell lines resistant to the tumor promoter and multiple stress-inducer, deoxycholate. **Carcinogenesis**; v. 23, p. 2063-2080, 2002.

DHILLON, A.S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22,p. 3279-90, 2007.

DIAS, F.L. **Análise do valor prognóstico de fatores histopatológicos e da expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides estágio I da língua e soalho bucal.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

DIVYA, C.S.; PILLAI M.R. Antitumor Action of Curcumin in Human Papillomavirus Associated Cells Involves Downregulation of Viral Oncogenes, Prevention of NFkappaB and AP-1 Translocation, and Modulation of Apoptosis. **Mol Carcinogen**, v.45, p.320-332, 2006.

DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI; L. O.; SILVA, T. G. A.; MORAIS, M. C. C. XIMENES, V. F.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biol**, v.31, n. 5, p.513-522, 2010.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases:Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.** v. 68, p.383-424, 1999.

EL-MOFTY, S. Chemical carcinogenesis in the rat submandibular gland. **Egypt Dent J.**, v. 23, n. 2, p. 65-75, 1977.

EL-NAGGAR, A.K.; LAI, S.; CLAYMAN, G.; LEE J.K.J; LUNA M.A.; GOEPFERT, H.; BATSAKIS, J.G. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Pathol**, v. 151, p. 1767-1774, 1997.

ELSTEIN, K. H.; ZUCKER, R. M. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. **Exp Cell Res**, v.211, p.322-331, 1994.

ENDO, H.; ONO, T.; SUGIMURA, T. Endo H, Ono T, Sugimura T. Chemistry and biological action of 4-nitroquinoline-1-oxide. **Recent Results Cancer Res**, v. 34, p. 17-30, 1971.

FARIA P.R.; **Carcinogênese bucal induzida pela 4NQO em língua de camundongo.** Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2006.

FAVERO, E.; DEDIVITIS, R.A.; FERRAZ, L.G.C.; SANTO, K.S.E.; FRANZ, S.A. Valor prognóstico da infiltração perineural e invasão muscular em carcinoma epidermoide avançado da boca e orofaringe. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 39, n. 2, p. 107-112, 2010.

GRAWISH, M.E.; ZYADA, M.M.; ZAHER, A.R. Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. **Med Oncol**, v. 28, n. 4, p. 1163-8, 2011.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.** v. 455, p. 81–95, 2000.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M.; SIQUEIRA, D. H. S. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem Pharm Bull**, v. 56, n. 5, p. 723-726, 2008.

FERREIRA, F. G.; REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, A.M.; CAMPOS, J. A. D. B.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, R. A.; BASSI, C.L.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Rev Bras Farmacogn**, v.19, n. 1A, p. 61-67, 2009.

FRACALOSSO, A.C.C.; COMPARINI, L.; FUNABASHI, K.; GODOY, C.; IWAMURA, E.S.M.; NASCIMENTO, F.D.; NADER, H.B.; OSHIMA, C.T.F.; RIBEIRO, D.A. Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J Oral Pathol Med**, v. 40, p. 325–333, 2011.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease, **Cell**, v.147, n. 4, p.742-768, 2011.

GILLISON, M.L. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. **Semin Oncol**, v. 31, n. 6, p. 744–54, 2004.

GONZALEZ, M.V.; PELLO M.F.; LOPEZ-LARREA, C.; SUAREZ, C.; MENENDEZ, M.J.; COTO, E. Deletion and methylation of the tumor suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v. 50, p. 509-512, 1997.

HAAN, C.; BEHRMANN, I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **J Immunol Methods**. v.10, v.318, n.1-2, p. 11-9, 2007.

HALL, M. Carbohydrates. In: ANDERSON, S.C.; COCKAINE, S. (Eds). **Clinical Chemistry: Concepts and Applications**. New York: McGraw-Hill, 2003. cap.10, p.153-178

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v.144, p. 646-674, 2011.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; ITO, T.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J.; MAEDA, M.; WATANABE, G.; IMAMURA, M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer**, v.39, p.2239-2246, 2003.

HAVELKA, A. M.; BERNDTSSON, M.; OLOFSSON, M. H.; SHOSHANMC, LINDER, S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an “off-target” effect? **Mini Reviews Med Chem**, v.7, n.10, p.1035-9, 2007.

HAZEN, M. J.; GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, M. G. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, v.3(4), p.333-5, 1988.

HEAD AND NECK CANCERS. *South Asian Journal of Cancer*, v. 4, 2015.

HENRIQUES, A.C.G.; CAZAL, C.; LINS, R.C.; CASTRO, J.F.L. Análise Morfológica da Mucosa Oral de Ratos Submetida à Carcinogênese Experimental pelo Óxido de Nitroquinolina (4NQO). **Pesq Bras Odontoped Clín Integr**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2011.

HOLLER, N.; ZARU, R.; MICHEAU, O.; THOME, M.; ATTINGER, A.; VALITUTTI, S.; BODMER, J.L.; SCHNEIDER, P.; SEED, B.; TSCHOPP, J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, p. 489-95, 2000.

HOTCHKISS, R.S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J.E.; SWANSON, P.E. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. **N Engl J Med.**, v. 361, n. 16, p. 1570-1583, 2009.

HOYER-HANSEN, M.; BASTHOLM, L.; SZYNIAROWSKI, P.; CAMPANELLA M.; SZABADKAI, G.; FARKAS, T.; BIANCHI, K.; FEHRENBACHER, N.; ELLING F.; RIZZUTO, R.; MATHIASSEN, I.S.; JÄÄTTELÄ, M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. **Mol Cell**, v. 25, n. 2, p. 193-205, 2007.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 21 nov. 2016.

JANG, Y.; LEE, A.Y.; CHANG, S.H.; JEONG, S.H.; PARK, K.H.; PAIK, M.K.; CHO, N.J.; KIM, J.E.; CHO, M.H. Trifloxystrobin induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in HaCaT, human keratinocyte cells. **Drug Chem Toxicol**, v.40, n.1, p. 67-73, 2016.

JESUS, G.P.P.; RIBEIRO, F.A.P.; MOURA, C.F.G.; GOLLUCKE, A.P.B.; OSHIMA, C.T.F.; RIBEIRO, D.A. 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**, v. 24, n. 4, p. 276–283, 2014.

KALAVREZOS, N.; SCULLY, C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. **Dent Update**, v. 42, n. 9, p. 866-8, 871-4, 877; 2015.

KAMB, A.; GRUIS, N.A.; WEAVER-FEJDHAUS, J.; LIN, Q. Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE and Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science**, v. 264, p. 436-440, 1994.

KANDARKAR, S.V.; SAWANT, S.S.; READE, P.C. Ultrastructural changes to the palatal mucosa of rats following the application of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) and vitamin C. **Oral. Oncol**, v. 34, p. 247–252, 1998.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M.M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol.**, v. 42, n.7, p. 655-67, 2006.

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 1–27, 1995.

KIGNEL, S.; BORDINI, P.J.; GROSSO, S.F.B.; COSTA, S.C. **Estomatologia, bases do diagnóstico para o clínico geral**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2015.

KITANO, M. Host genes controlling the susceptibility and resistance to squamous cell carcinoma of the tongue in a rat model. **Pathol Int**, v. 50, p. 353–362, 2000.

KLATT, E.C., et al. **Robbins and Cotran review of pathology**. 3rd. ed. Philadelphia, Pa.; London: Saunders, 2010.

KOHN, H. I; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. J. **Pharmacol. Exp. Therap**, v. 82, p. 292-300, 1944.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p.1415-1420, 1994.

KUJAN, O.; OLIVER, R.J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S.A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, 2006.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS. **Robbins basic pathology**. 7th. ed. Philadelphia, Pa.; London: Saunders, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LEE, Y.M.; AUH, Q.S.; LEE, D.W.; KIM, J.Y.; JUNG, H.J.; LEE, S.H.; KIM, E.C. Involvement of Nrf2-Mediated Upregulation of Heme Oxygenase-1 in Mollugin induced growth inhibition and apoptosis in human oral cancer cells. **Bio Med Res Int**, v. 2013, Article ID 210604, 2013.

LI, J.; LI, Q.; FENG, T.; LI, K. Aqueous extract of *Solanum nigrum* inhibits growth of cervical carcinoma (U14) via modulating immune response of tumor bearing mice and inducing apoptosis of tumor cells. **Fitoterapia**, v.79, p.548–556, 2008.

LI, L. Y., LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**, v. 412, p. 95-99, 2001.

LIN, Y.; CHOKSI, S.; SHEN, H.M.; YANG, Q.F.; HUR, G.M.; KIM, Y.S.; TRAN, J.H.; NEDOSPASOV, S.A.; LIU, Z.G. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 10822-8, 2004.

LIU J.; WANG Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2015, Article ID 294303, p. 1-12, 2015.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3^a ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2000b. p. 395.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v.193, n.1., p. 265-275, 1951.

LOTAN, R.; XU, X.C.; LIPPMAN, S.M.; RO, J.Y.; LEE; J.S.; LEE; J.J.; HONG; W.K. Suppression of retinoic acid receptor- β in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. **N Engl J Med**, v. 332, p. 1405-10, 1995.

MACIOROWSKI, Z.; DELIC, J.; PADOY, E.; KLIJANIENKO, J.; DUBRAY, B.; COSSET, J-M.; DUMONT, J.; MAGDELÉNAT, H.; VIELH, P. Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Hodgkin's lymphomas. **Cytometry**, v. 32, p. 44-50, 1998.

MADLE, E.; OBE, G.; HANSEN, J.; RISTOW, H. Harman and norharman: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. **Mutagen Res**, v.90, n.4, p.433-42, 1981.

MAINENTI, P.; **Imunofenotipagem de lesões obtidas em carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvegicus*)**. Tese (Doutorado)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José dos Campos, 2013.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer**. v.2, p.143-148, 2002.

MANSILLA, S.; PRIEBE, W.; PORTUGAL, J. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Cell Cycle**, v. 5, n. 1, p. 53-60, 2006.

MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; IWAMI, J.; LI, X.; PONGPIRIYADACHA, Y.; NAKAI, M.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y.; YOSHIKAWA, M. Invasion Inhibitors of Human Fibrosarcoma HT 1080 Cells from the Rhizomes of *Zingiber cassumunar*: Structures of Phenylbutanoids, Cassumunols. **Chem Pharm Bull**, v. 59, n.3, p. 365-370, 2011.

MATSUO, F. S. **Estudo da via de sinalização PI3K/AKT e GSK3 β em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

MCCANN, J.; SPINGARN, N.E.; KOBORI, J.; AMES, B.N. Detection of carcinogen as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 72, p.979–983, 1975.

MCCORMICK, D.L.; PHILLIPS, J.M.; HORN, T.L.; JOHNSON, W.D.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A. Overexpression of cyclooxygenase-2 in rat oral cancers and prevention of oral carcinogenesis in rats by selective and nonselective COX inhibitors. **Cancer Prevent Res** ; v. 3, n.1, p. 73-81, 2010.

MEHDIPOUR, M.; TAGHAVI ZENOZ, A.; MESGARI ABBASI M.; MOHAJERI, D.; DAMGHANI, H.; HELLI, S.; ABDOLLAHI, B. 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**, v. 7, n. 4, p. 218-24, 2013.

MINAFRA, L.; BRAVATA, V. Cell and molecular response to IORT treatment. **Transl Cancer Res**, v. 3, n.1, p. 32-47, 2014.

MINICUCCI, E.M.; RIBEIRO, D.A.; DA SILVA, G.N.; PARDINI, M.I.; MONTOVANI, J.C.; SALVADORI, D.M. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4- nitroquinoline 1-oxide. *Exp. Toxicol. Pathol*, v. 63, p. 483-9, 2011.

MITHANI, S.K.; MYDLARZ, W.K.; GRUMBINE, F.L.; SMITH, I.M.; CALIFANO, J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Dis**, v. 13, p. 126–133, 2007.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J.F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc-annexin V. **J Nuclear Med**, v.44, n.1, 2003.

MOHANTA, A.; MOHANTY, P.K.; PARIDA, G. An in vivo cytogenetic analysis of human oral squamous cell carcinoma. **South Asian J Cancer**, v. 4, n. 3, p. 123-6, 2015.

MOLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 98, p. 336–345, 2005.

NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. **Adv Cancer Res**, v. 23, p. 131–169, 1976.

NAKAYASU, M.; NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. Mutagenic activity of heterocyclic amines in Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a marker. **Mutagen Res**, v.118, n. 1-2, p.91-102, 1983.

NEIDLE, S.; THURSTON, D.E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nat Rev Cancer**. v.5, p.285-296, 2005.

NEVILLE, B. **Patologia oral & maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 423.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**. v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNAKARAKIS, N.; Crosstal between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim biophys Acta**. v. 1833, p. 3448-3459, 2013.

OCHIAI, E.; SEI, S.J. J. Pharmac Soc. Japan. 1945, 65: 18. In: NAKAHARA, W.; FUKUOKA, F.; SUGIMURA, T. Carcinogenic actions of 4 nitroquinoline N-oxide. **GANN**, v. 48, p.129-137, 1957. Carcinogenic actions of 4 nitroquinoline N-oxide. **YAKUGAKU ZASSHI**. 1945; 65 (2): 18. (artigo em japonês) Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi1881/65/2/65_2_18/_pdf

OHNE, M.; SATOH, T.; YAMADA, S.; TAKAI, H. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surg. Oral Med.* **Oral Pathol**, v. 59, p. 600–607, 1985.

OZTURK, I.C.; BATCIOGLU, K.; KARATAS, F.; HAZNECI, E.; GENÇ, M. Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. **Indian J Dermatol**, v. 53, p.106-109, 2009.

PASQUINI NETTO, H.; MANENTE, F.A.; MOURA, E. L.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; VELLOSA, J. C. R.; Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* TUL. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Rev Bras Plantas Med.**, v. 14, n.4, 2012.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochem Pharmacol**, v.65, p.1451–1461, 2003.

PENG, X.; LI, W.; JOHNSON, W.D.; TORRES, K.E.; MCCORMICK, D.L. 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**; v. 10, p.1 e 0116285, 2015.

PETER, M.E. Apoptosis meets necrosis. **Nature**, v. 471, p. 310-2, 2011.

PIMENTA, F.J.; CORDEIRO, G.T.; PIMENTA, L.G.G.S.; VIANA, M.B.; LOPES, J.; GOMEZ, M.V.; ALDRAZ, C.M.; DE MARCO, L.; GOMEZ, R.S. Molecular Alterations in the Tumor Suppressor Gene WWOX in Oral Leukoplakias. **Oral Oncol**, v. 44, n. 8, p. 753-8, 2008.

PINKUS, H. Lichenoid tissue reactions. A speculative review of the clinical spectrum of epidermal basal cell damage with special reference to erythema dyschromicum perstans. **Arch Dermatol**, v. 107, p. 840-6, 1973.

PITANGUI, N.S.; SARDI, J.C.O.; VOLTAN, A.R.; SANTOS, C.T.; SILVA, J.F.; SILVA, R.A.M.; SOUZA, F.O.; SOARES, C.P.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M.L.; MENDES-GIANNINI; M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA; A.M. An Intracellular Arrangement of *Histoplasma capsulatum* Yeast Aggregates Generates Nuclear Damage to the Cultured Murine Alveolar Macrophages. **Frontiers Microbiol**, v. 6. Article2016. doi: 10.3389/fmicb.2015.01526.

POPIOLEK, D.; VENTURA, K.; MITTAL, K. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. **Oncol Rep.**, v.11, n.3, p.687-91, 2004.

PRICE, K.A.; COHEN, E.E. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. **Curr Treat Options Oncol**, v. 13, n. 1, p. 35-46, 2012.

RADOGNA, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. **Biochem Pharmacol.**, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2015.

REGASINI, L.O. **Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcalóides guanidínicos e análogos.** 2008. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

REGASINI, L.O.; FERNANDES D.C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M., BOLZANI V.S., BARREIRO E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quim Nova**, n. 31, p. 802- 806, 2009.

REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; GIANNINI, M.J.S.M.; BARREIRO E.J.; SILVA, D.H.S.S.; BOLZANI, V.S. *Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi.* **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, p. 706-711, 2010.

REGASINI, L.O.; FERNANDES D.C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M., BOLZANI V.S, BARREIRO E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quim Nova**, n. 31, p. 802-806, 2008a.

REGASINI, L. O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v.69, p. 1739-1744, 2008b.

REUTER, S.; GUPTA, S.C; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**; v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M.F.; SILVA, R.N.; DARROS, B.R.; MARQUES, M.E.A. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral. Oncol**, v. 40, p. 910–915, 2004.

RIBEIRO D.A. **Evolução do carcinoma espinocelular na mucosa bucal induzido pela 4NQO (4- nitroquinolina 1-oxido) em ratos wistar**. Tese (Doutorado). Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2005.

RIBEIRO, F.A.; DE MOURA, C.F.; GOLLUCKE, A.P.; FERREIRA, M.S.; CATHARINO, R.R.; AGUIAR, O. JR.; SPADARI, R.C.; BARBISAN, L.F.; RIBEIRO, D.A. Chemopreventive activity of apple extract following medium-term oral carcinogenesis assay induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 8, p. 815-21, 2014.

RIBEIRO, F.A.; PERES, R.C.; OSHIMA, C.T.; SPOLIDORIO, L.C.; MALUF LLE, S.; RIBEIRO, D.A. Antioxidant activity of apple extract protects against rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Toxicol Mech Methods**, v. 25, n. 7, p. 532-7, 2015.

ROJAS, M.; CASCORBI, I.; ALEXANDROV, K.; KRIEK, E.; AUBURTIN, G.; MAYER, L. Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1927–1931, 1999.

RONINSON, I.B.; BROUDE, E.V.; CHANG, B.D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resist Updat**, v. 4, n. 5, p. 303-13, 2001.

SABA, N.F.; HAIGENTZ, M. Jr.; VERMORKEN, J.B.; STROJAN, P.; BOSSI, P.; RINALDO, A.; TAVARES R.P.; FERLITO, A. Prevention of head and neck squamous cell carcinoma: removing the "chemo" from "chemoprevention". **Oral Oncol**, v. 25, n. 2, p. 112-8, 2015.

SACKS, P.G.; SCHANTZ, S.P.; CHAGANTI, R.S. Homozygous deletions and loss of expression of the CDKN2 gene occur frequently in head and neck squamous cell carcinoma cell lines but infrequently in primary tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 13, p. 94-98, 1995.

SASAKI, Y. F.; YAMADA, H.; SHIMOI, K.; KINAE, N.; TOMITA, I.; MATSUMURA, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. Enhancing effects of heterocyclic amines and beta-carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells. **Mutat Res.**, v.269, n.1, p.79-95, 1992.

SCANDINAVIAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL PHYSIOLOGY. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v, 33, p. 291-306, 1974.

SCHANTZ S.P.; HARRISON, L.B.; HONG, W.K. Tumors of the oral cavity and oropharynx. In: DeVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSEMBERG, A.S. (eds.) **Cancer: principles and practice of oncology**. 4th ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 1993. p:547-630. <https://oncouasd.files.wordpress.com/2014/09/cancer-principles-and-practice-of-oncology-6e.pdf> (sexta edição pdf online)

SCHEPMAN E.H.; VAN DER MEIJ, L.; SMEELE, E.; VAN DER WAAL, I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands K.P. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 276275, 1998.

SCHEPMAN, K.P.; VAN DER WAAL, I. A Proposal for a Classification and Staging System for Oral Leukoplakia: a Preliminary Study. **Eur J Cancer B Oral Oncol.**, v.31, p. 396-398, 1995.

SCHERZ-SHOVAL, R.; SHVETS, E.; FASS, E.; SHORER, H.; GIL, L.; ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **Embo J**, v. 26, n. 7, p. 1749-60, 2007.

SCHMITTA, E. M. M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mutation Research - Genetic Toxicol Environmen Mutagen.*, v.542, p.43-48, 2003.

SEMBA, S.; ITOHI, N.; ITO, M.; HARADA, M.; YAMAKAWA, M. The *in Vitro* and *in Vivo* Effects of 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3'-Kinase, in Human Colon Cancer Cells. **Clin Cancer Res.**, v. 8, p. 1957-1963, 2002

SEMBA, S.; ITOHI, N.; ITO, M.; YOUSSEF, E. M.; HADARA, M.; MORIYA, T.; KIMURA, W.; YAMAKAWA, M. Down regulation of *PIK3CG*, a Catalytic Subunit of phosphatidylinositol 3-OH Kinase, by CpG Hypermethylation in Human Colorectal Carcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 8, p. 3824-3831, 2003.

SHARMA, M.K.; GOUR, N.; PANDEY, A.; WALLIA, D. Epidemiological study of risk factors for oral, laryngeal and esophageal cancers at a tertiary care hospital in India. **Asian Pac. J. Cancer Prev**, v. 12, p. 1215–1218, 2011.

SHASHIKALA, R.; INDIRA, A.P.; MANJUNATH, G.S.; ARATHI RAO, K.; AKSHATHA, B.K. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 7, p. 409–413, 2015.

SHIBAI-OGATA, A.; KAKINUMA, C.; HIOKI, T.; KASAHARA, T. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. **Mutagenesis**, v.26, n. 6, p.709–719, 2011.

SHIGA, K.; OGAWA, T.; KATAGIRI, K.; YOSHIDA, F.; TATEDA, M.; MATSUURA, K.; KOBAYASHI, T. Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level. **Oncol Lett.**, v. 3, p. 238-243, 2012.

SHIMIZU, T.; KAWAI, J.; OUCHI, K.; KIKUCHI, H.; OSIMA, Y.; HIDEKI, R. Agarol, an ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. **Int J Oncol.**, v. 48, n. 4, p. 1670-8, 2016

SHIN, M.R.; LEE, H.J.; KANG, S.K.; AUH, Q.S.; LEE, Y.M.; KIM, Y.C.; KIM, E.C. Isocudraxanthone K Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Oral Cancer Cells via Hypoxia Inducible Factor-1 α . **BioMed Res. Int.**, v.2014, Article934691, 2014. doi: 10.1155/2014/934691. Epub 2014 Jul 3.

SHROTRIYA, S.; AGARWAL, R.; SCLAFANI, R.A. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. **Adv Exp Med Biol**, v. 815, p. 333-48, 2015.

SINGH, R.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. **Cell Div**, v. 5, p. 4, 2010.

SIRIKANTARAMAS, S.; ASANO, T.; SUDO, H.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Camptothecin: therapeutic potential and biotechnology. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 8, p.196-202, 2007.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SPARKS, C.A.; GUERTIN, D.A. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. **Oncogene**, v. 29, p. 3733–3744, 2010.

SULTANA, J.; BASHAR, A.; MOLLA, M.R. New Management Strategies of Oral Tongue Cancer in Bangladesh. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 13, n.4, p. 394-400, 2014.

SORBO, J.M. **Efeito antitumoral do alcalóide nitensidina A em camundongos nude BALC/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa)**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 376-90, 2013.

SOUZA, F. O. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de nitensidina B em células de carcinoma cervical SiHa e C-33A**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SUN, Z., et al. Chemoprevention of oral cancer in animal models, and effect on leukoplakias in human patients with ZengShengPing, a mixture of medicinal herbs. **Oral Oncol.**, v. 46, n.2, p. 105-10, 2010.

TAHER, M.; SUSANTI, D.; REZALI, M.F.; ZOHRI, F.S.A. Apoptosis, antimicrobial and antioxidant activities of phytochemicals from *Garcinia malaccensis* Hk.f. **J Trop Med.**, p. 136-141, 2012.

TAJIMA, Y.; MURASE, H.; SATAKE, K.; MITANI, Y.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; EFFERTH, T. Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, induces osteoclastic cell death. **Cytotechnology**, v. 67, p. 585-592, 2015.

TANAKA, T. Chemoprevention of oral carcinogenesis. **Eur J Cancer**, v. 31, p. 3–15, 1995

TANAKA, T.; KOHNO, H.; SAKATA, K.; YAMADA, Y.; HIROSE, Y.; SUGIE, S.; MORI, H. Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline 1-oxide induced rat tongue carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1361–1367, 2002.

TANG, X.H.; KNUDSEN, B.; BEMIS D.; TICKOO, S.; GUDAS, L.J. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogentreated mice. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 301–313, 2004.

TANG, X.H.; OSEI-SARFOA, K.; URVALEKA, A.M.; ZHANG, T.; SCOGNAMIGLIO, T.; GUDASA, L.J. Combination of bexarotene and the retinoid CD1530 reduces murine oral-cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 24, p. 8907–8912, 2014.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev. Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 2008.

TONIN, G.A.; GATTI, A.B.; CARELLI, B.P.; PEREZ, S.C.J.G.A., Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens*. **Rev Bras Sementes**, v. 27, n.2, p. 35-43, 2005.

TEMKIN, V.; HUANG, Q.; LIU, H.; OSADA, H.; POPE, R.M. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 6, p. 2215-25, 2006.

TOMINAGA, K.; PEREIRA-SMITH, O.M. The role of chromatin reorganization in the process of cellular senescence. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 13, p. 1593-602, 2012.

TORRIGLIA, A.; PERANI, P.; BROSSAS, J. Y.; ALTAIRAC, S.; ZEGGAI, S.; MARTIN, E.; TRETON, J.; COURTIS, Y.; COUNIS, M. F. A caspasein dependent cell

clearance program. The LEI/L-DNase II pathway. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 926, p. 192-203, 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J. Clin. Pathol.** v.22, p.158-161, 1969.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ.**, v. 15, p. 1153-1162, 2008.

VELLOSA, J.C.R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araraquara, Araraquara, 2005. p. 64.

VERED, M.; DANIEL, N.; HIRSHBERG, A.; DAYAN, D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. **Oral. Oncol**, v. 39, p. 491–496, 2003.

VISWANADHA, V.P.; SIVAN, S.; SHENOI, R.R. Protective effect of Spirulina against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. **Mol Biol Rep.**, v.38, p.309-317, 2011.

VITALE-CROSS, L.; CZERNINSKI, R.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; PATEL, V.; MOLINOLO, A.A.; GUTKIND, J.S. Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-targeted prevention and treatment of oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 2, p. 419–422, 2009.

VIZZOTTO JUNIOR, A.O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; CAMPOS, A.C.L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 39, n.2, p. 143-149, 2003.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods Mol Med.**, v. 110, p. 39–48, 2005.

WHEATE, N. J.; BRODIE, C. R.; COLLINS, J.G.; KEMP, S.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **Mini Rev Med Chem**, v.7, n.6, p.627-48, 2007.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 1 nov. 2015.

WHO. World health Organization Classification of Tumours. **Pathology & Genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.

WOLPAW, A.J.; SHIMADA, K.; SKOUTA, R.; WELSCH, M.E.; AKAVIA, U.D.; PEER, D.; SHAIK, F.; BULINSKI, J.C.; STOCKWELL, B.R. Modulatory profiling identifies mechanisms of small molecule-induced cell death. **PNAS**, v. 108, n. 39, p. 771-80, 2011.

WRÓBLENSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic- pyruvic transminase in cardiac and hepatic deases. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.91, p. 569-571, 1956.

YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, catheFSin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Prog. Neuro biol.**, v. 62, p. 273-295, 2000.

KATSUSABURO YAMAGIWA, K.; ICHIKAWA, K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. **J Cancer Res.**, v. 111, n. 1, 1918.

Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. **J Cancer Res.** 1918;3:1–21.

ZAMRI N.D.M., IMAM M.U., GHAFAR S.A.A., ISMAIL, M. Antioxidative effects of germinated brown rice-derived extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**; 2014.

ZHANG, X.; et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochim Biophys Acta.** v. 1813, p. 1978-1986, 2011.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cell cycle and cell death in disease: past, present and future. **J Internal Med**, v. 268, p. 395-409, 2010.

ZHOU, G.; HASINA, R.; WROBLEWSKI, K.; MANKAME, T.P.; DOÇI, C.L.; LINGEN, M.W. 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)**, v. 3, n. 11, p. 1493-502, 2010.

ZONG, W.X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D.E.; WANG, Z.Q.; THOMPSON, C.B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes Dev**, v. 18, n. 11, p. 1272-82, 2004.