



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



Caroline Camizotti Guerra

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

Araraquara

2022



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



Caroline Camizotti Guerra

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

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

Orientador: Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2022

G929c

Guera, Caroline Camizotti

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Caroline Camizotti Guerra

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

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências odontológicas

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

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

3º Examinador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Araraquara, 08 de setembro de 2022.

DADOS CURRICULARES

Caroline Camizotti Guerra

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

FILIAÇÃO: Andreia Lima Camizotti

Gerson Luiz Guerra

2014/2019: Curso de graduação em odontologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

2018/2018: Curso de Atualização em Cirurgia Oral Menor

Associação Brasileira de Odontologia – ABO

2019/2019: Curso de Aperfeiçoamento em Estomatologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

2020/2022: Mestrado em Ciências Odontológicas

Universidade Estadual Paulista – UNESP

AGRADECIMENTOS

À minha família,

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

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

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

Ao departamento de Diagnóstico e Cirurgia,

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

Descrever o impacto da exposição crônica de Terpinen-4-ol (negativo, TP-4-ol[-]) na microbiota oral de ratos (*Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*).

Verificar a correlação do pool de microrganismos, pool de bactérias, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* a presença de CEC em ratos induzidos por câncer 4-NQO.

E por fim, a partir da análise de correlação, avaliar a possibilidade desses microrganismos de identificar a presença de carcinoma espinocelular in situ, micro-invasivo, invasivo e invasivo profundo induzido por 4-NQO.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Neste trabalho fizemos uma revisão de literatura por tópicos acerca dos temas apresentados.

3.1 Carcinoma Espinocelular

Atualmente, o câncer de cabeça e pescoço (CCP), especificamente o CEC de cavidade oral, caminha para se tornar a principal causa de morbidade e mortalidade na população mundial². No mundo, o câncer de boca e faringe ocupam o 6º lugar das malignidades mais comuns, e no Brasil, o câncer oral é o 7º mais frequente⁵⁵. Apresenta maior incidência entre as faixas etárias de 50 a 60 anos e uma predileção em localizar na região de língua e assoalho bucal⁵⁵.

A etiopatogenia está relacionada com a presença de múltiplos fatores carcinogênicos atuando sobre o epitélio normal, o que resulta em um processo de displasia, a qual se caracteriza pela presença de atipias celulares e na perda da estratificação normal do tecido⁵⁶. Gupta Metgud⁵⁷ (2013), o câncer bucal é, em grande parte, atribuível a agentes cancerígenos ambientais. Portanto, a maioria das neoplasias em cavidade oral pode ser facilitada por hábitos como o álcool e o tabagismo, principalmente se combinados⁵⁷.

A língua é a localização topográfica mais frequente das neoplasias de boca, além disso, o sítio anatômico acometido pelo tumor, o tipo histológico e o estadiamento clínico são fatores prognósticos para a doença⁵⁸. As taxas de sobrevida para o câncer de língua localizado na região anterior (1/3) é 78% e 61% na região posterior (2/3)¹². A sobrevida para as mulheres é mais favorável (55%) quando comparado aos homens (45%)⁵⁹. Por consequência, ao frequente diagnóstico avançado, os tratamentos costumam ser complexos, multidisciplinares e de altos custos, envolvendo cirurgia, radioterapia e, por vezes a quimioterapia. As principais localizações do carcinoma de língua são a base e a borda lateral, regiões de difícil acesso e visualização em métodos de rastreamento e detecção precoce, o que colabora para o diagnóstico tardio da doença⁶⁰⁻⁶⁵.

Em 80% dos casos de CEC, os diagnósticos são realizados em pacientes em estádios III e IV, os quais apresentam risco até 3,3 vezes maior de apresentarem metástases em linfonodos e pulmões⁶⁶.

As análises histopatológicas das biópsias de carcinoma de língua descrevem áreas de displasia grave ou carcinoma⁶⁷ com proliferação intensa de células epiteliais, mitoses atípicas, disqueratoses, assim como ninhos e cordões de células epiteliais hipercromáticas e pleomórficas atípicas invadindo o tecido conjuntivo e fibras musculares, além da presença de áreas de necrose⁶³.

3.2 Microrganismos e o Câncer Bucal

Estudos encontrados na literatura identificaram alguns microrganismos da cavidade oral com poder de desencadear o mecanismo de carcinogênese oral pelo metabolismo do álcool revertido em carcinógeno de acetaldeído. Sendo mais drástico quando associado aos fatores de risco como higiene bucal deficiente, uso de álcool e tabaco⁶⁸. Outros mecanismos bacterianos estão relacionados a indução de citocinas inflamatórias na progressão invasiva do CEC de cavidade oral, indução de macrófagos na supressão tumoral¹³ e fatores de virulência no desenvolvimento e progressão tumoral.⁶⁹ E ainda, associados a estudos que comprovam a quantificação aumentada na microbiota oral de pacientes com CEC de cavidade oral comparado aos saudáveis nos seguintes microrganismos: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Helicobacter pylori*, *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Veillonella parvula*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp*¹⁵⁻²². A proporção destes microrganismos foi diretamente relacionado ao grau de malignidade da lesão oral²³. Podendo tornar-se um biomarcador para progressão de lesões pré-malignas, detecção precoce, subtipos e comportamento clínico (metástase) do CEC de cavidade oral a partir de pesquisas biomoleculares da microbiota oral, consequentemente aumentando a taxa de sobrevivência dos portadores^{12,16,25}.

Segundo o estudo de Yamamoto e Gacek⁶⁹ (2012), a microbiota normal da cavidade oral de ratos da linhagem Wister apresetaram as seguintes bactérias Gram-positivas sem indicação do período experimental: *Staphylococcus aureus* (30%), *Staphylococcus saprophyticus* (13,3%), *Enterococcus faecalis* (10%), *Staphylococcus capitis* (6,6%), *Leuconostoc citreum* (6,6%), *Staphylococcus auriculares* (6,6%), *Staphylococcus epidermidis* (6,6%), *Staphylococcus lentus* (6,6%), *Staphylococcus simulans* (6,6%) e *Streptococcus anginosus* (3,3%). Já no estudo de Porto et al.⁷⁰

(2007) com as mesmas linhagens de ratos machos nutridos, demonstrou a seguinte ordem das frequências das bactérias aeróbias no período de 16 semanas: *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*. Destas 70% foram de bactérias gram-positivas e 30% de bactérias gram-negativas. Sendo que a maior concentração foi verificada nos ratos desnutridos.

3.3 Terpinen-4-ol (TP-4-ol)

A *Melaleuca alternifolia* é uma árvore nativa da região norte e sul da Austrália e seu óleo, também chamado de “Tea Tree oil”, TTO, é extraído das folhas ou ramos por processo de destilação a vapor³¹.

O TTO demonstrou atividades anti-inflamatória, bactericida, analgésica, antivirótica, antifúngica e antitumoral^{71,72}. Também foram observadas ações clínicas na mucosa oral em uso tópico, reduzindo inflamação e infecção sem apresentar efeitos adversos³¹.

Dentre os 100 quimiotipos do TTO, o TP-4-ol é o mais concentrado e abundante e é encontrado em diversas outras plantas aromáticas de várias regiões do mundo, como a laranjeira, a tangerineira, o limoeiro, o cedro e a pimenteira (pimenta preta)³².

O terpinen-4-ol (TP-4-ol), tem sido associado a antibacteriano³²⁻³⁴, antifúngico³⁵, antiparasitário³⁶, antiviral³⁷, relaxante da musculatura lisa vascular³⁸, hipotensor³⁹, anticonvulsivante⁴⁰, anti-inflamatório⁴¹, antioxidante⁴², quimiopreventivo do câncer^{43,44}.

Além disso, estudos da atividade antitumoral do TP-4-ol demonstraram estímulo da morte celular em células malignas pela indução de apoptose dependente de caspase e necrose e interrupção do ciclo celular em concentrações que variaram de 0,005% a 0,1%, 1%, que incluía linhagens celulares de carcinoma epitelíode (HeLa), leucemia linfoblástica humana de células T (MOLT-4), leucemia mielóide crônica humana (K562), leucemia mielóide aguda de células B humana (CTVR-1), melanoma humano (B16), melanoma humano, variante resistentes a drogas (M14WT), mesotelioma murinos (Ae17), adenocarcinoma de pulmão humano (A549), carcinoma de pequenas de pulmão de camundongos (A549/CL1-0); carcinoma hepatocelular humano (HepG2), e adenocarcinoma coloretal humano (DLD-1) e chegaram a demonstrar inibição de proliferação de 20-56% na proliferação celular

(fase G₂/M do ciclo celular), indução de morte celular por apoptose em 45-90% e, até mesmo, ausência de necrose^{44,45}. Wu et al.⁴⁵, cita que mecanismos de ação antitumoral do TP-4-ol demonstram-se dose-dependente e relacionados a morte celular por apoptose, associada a interrupção do ciclo celular no ponto de checagem sub-G₁.

Recentemente, realizamos experimento de câncer induzido por óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) para verificar a eficácia de inibição de Terpene-4-ol (TP-4-ol) decorrente de câncer de língua oral que é semelhante a outros quimioterápicos estudos preventivos^{27,28}. O monoterpeno (TP-4-ol) apresenta dois estereoisômeros. Esses isômeros ópticos são (-)-Terpinen-4-ol [(R)-p-Menth-1-en-4-ol, (R)-1-Isopropil-4-metil-3-ciclohexen-1-ol] e (+)-Terpinen-4-ol [(S)-p-Ment-1-en-4-ol, (S)-1-Isopropil-4-metil-3-ciclohexen-1-ol]⁴⁵. Resultados anteriores relataram efeito antimicrobiano do TP-4-ol, porém, não foram descritos no isômero óptico¹³⁻²². Nosso grupo descreveu a atividade antineoplásica do isômero negativo TP-4-ol [(-)-Terpinen-4-ol] no carcinoma espinocelular oral.

3.4 Óxido de 4-Nitroquinolina

O 4-NQO é uma substância carcinogênica do grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sendo considerada a melhor substância disponível para as produções de carcinogênese oral⁵¹. Sua ação carcinogênica foi associada à indução de mutações em bases nitrogenadas do DNA, deleções e conversões genéticas e aberrações cromossômicas, além de quebras e trocas de cromatina (Tanaka et al.⁹⁶, 2002). O seu uso em modelos de carcinogênese experimental teve início na década de 1960 e 1970^{52,53}.

O 4-NQO pode ser administrado por via oral, na água de beber, de fácil aplicação. Este modelo é amplamente explorado por apresentar alta efetividade carcinogênica e grande semelhança com o processo de carcinogênese humana. A droga é capaz de induzir a formação carcinogênica em estágios sequenciais, mimetizando alterações histológicas e moleculares que ocorrem em humanos, resultando em tumores diferenciados⁵⁴.

O modelo também permite controlar as condições experimentais, garantindo reprodutibilidade, com reduzidas variações. Isto permite intervenções em diferentes estágios do processo de carcinogênese, como por exemplo durante a fase de progressão dos tumores. De fato, é possível identificar lesões potencialmente

malignas e malignas, assim como analisar possíveis efeitos renais e hepáticos associados ao tratamento e/ou ao 4-NQO⁵⁴.

No entanto, quando se lança mão desse modelo, para um estudo de quimioterápicos, por exemplo, há a necessidade de eutanásia do rato, para que assim possamos avaliar se este animal está com câncer ou não.

Dessa forma, seria interessante um estudo que possibilite identificar se esse animal possui presença de câncer, para assim já começar o tratamento quimioterápico, sem a necessidade de morte do animal. Um marcador biológico, como o aumento de microrganismos, seria uma inovadora metodologia.

4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos foram divididos nas seguintes etapas.

4.1 Animais

Foram selecionados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus* albinos, Holtzman, 4 semanas, 120-130g) foram aclimatados durante uma semana. Eles foram alojados em ambiente controlado dia/noite (24°C, com claro/escuro [12/12h]). O estudo foi aprovado no Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (CEUA-FOAr, nº 8/2015).

4.2 4-NQO Indução de Câncer

Uma bebida de água ad libitum de 8 semanas (25 ppm de 4-NQO, Sigma-Aldrich(R), St. Louis, MO, EUA) foi usada para induzir o CEC. Após isso, o Terpinen-4-ol (8nL/ge 0,1nL/g) foi utilizado por mais 8 semanas e os ratos foram eutanasiados para realização de análises histopatológicas. A microbiota foi coletada um dia após o sacrifício dos animais.

4.3 Tratamento com Terpinen-4-ol

O TP-4-ol (25g, peso molecular 154,25 g/mol, 95% de pureza, Sigma-Aldrich(R), St. Louis, MO, EUA) foi administrado em duas doses purificadas com água, 8nL/g e 0,1 nL/g.

4.4 Design Experimental

Os grupos saudáveis foram mantidos com ração e água ad libitum por 16 semanas (Saudável) e os grupos 4-NQO receberam 25 ppm de 4-NQO nas primeiras 8 semanas e, após isso, mantidos em ração e água ad libitum por 8 semanas (4-NQO). Duas concentrações experimentais de TP-4-ol (8nL/ge 0,1nL/g) foram testadas em ambos os animais (saudáveis e expostos a 4NQO).

4.5 Coleta de Amostras Clínicas

As amostras para análise microbiológica foram coletadas um dia antes da eutanásia dos animais. Um swab umidificado com PBS (solução salina tamponada com fosfato) foi usado. A língua foi suavemente raspada com um swab enquanto o

rato era imobilizado¹⁶. O swab foi imediatamente colocado em frascos Eppendorf estéreis contendo 1 mL de PBS. 2 minutos do vórtice foi usado para suspender, e uma diluição seriada decimal foi realizada para plaqueamento em meio de cultura seletivo para *Streptococcus* sp (ágar mitis salivarius), *staphylococcus* (ágar gema de ovo hipertônico), e para *enterococcus faecalis* (M-enterococcus) e *Candida albicans* (saboroud dextrose). Após o crescimento dos microrganismos foi identificado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e realizada uma transformação log₁₀ para análise estatística.

4.6 Análise Histopatológica

Todas as amostras foram incluídas em parafina e cortes de 4 µM foram obtidos e corados em hematoxilina e eosina (H&E). Microscopia de luz (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha) foi usada em aumentos de 100, 200 e 400x para realizar a análise histopatológica e um patologista experiente realizou a análise histopatológica. Foram realizadas duas análises com intervalo de uma semana entre elas. A análise histopatológica da língua incluiu escores de invasão do câncer oral (CEC in situ, CCE micro-invasivo, CEC invasivo e CEC invasivo profundo). A displasia epitelial foi identificada e classificada em displasia baixa, moderada e grave. O infiltrado inflamatório foi classificado por tipo (agudo, crônico e misto) e por intensidade (intenso, moderado e leve). Este infiltrado também foi analisado próximo ao CEC. A acantose, hiperplasia papilar, papiloma e a presença de microrganismo superficial e conjuntival também foram descritos. Esses dados foram descritos anteriormente em nosso artigo publicado anteriormente. O outro estudo descreveu a potencial ação quimiopreventiva do TP-4-ol.

Quadro 1 – Classificação modificada da invasão microscópica do câncer lingual

Câncer lingual	Extensão tecidual
In situ	Presença de células malignas sem a presença de rompimento da membrana basal subjacente
Micro-invasivo	Presença de células malignas com perda de continuidade da membrana basal subjacente, onde observam-se células malignas.
Invasivo	Presença de células malignas ocupando a Lâmina própria de tecido conjuntivo, mas sem ocorrer a invasão do tecido muscular estriado subjacente.
Profundamente invasivo	Presença de células malignas ocupando a Lâmina própria de tecido conjuntivo e invadindo o tecido muscular estriado subjacente.

Fonte: Adaptada de McCormick et al⁴⁶.(2010)

4.7 Análise Estatística

Os dados do estudo foram analisados por meio do teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. Posteriormente, ANOVA unidirecional e teste de Dunnett para comparações com o grupo controle foram configurados separadamente para cada modelo e realizados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O método de Pearson foi selecionado para análise de correlação. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$. Para todos os resultados, três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

5 RESULTADO

Os animais induzidos por câncer por 4-NQO apresentaram redução de UFC/mL no pool de microorganismos e pool de bactérias em 4-NQO+8nL/g ($P<0,05$) em comparação ao grupo 4-NQO. O mesmo grupo 4-NQO+8nL/g apresenta redução na UFC/mL de *Enterococcus* sp ($P<0,05$) em relação ao grupo 4-NQO. A diferença não estatística foi verificada em *Candida albicans*, *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp.

A análise de correlação foi realizada utilizando acantose, hiperplasia papilar, displasia (leve, moderada e várias), papiloma, carcinoma espinocelular (CEC [in situ, micro-invasivo, invasivo e invasivo profundo]), infiltrado inflamatório (intensidade [inferior, moderado e intenso] e tipo [agudo, misto e crônico]), infiltrado inflamatório do CEC, presença de microrganismo epitelial superficial e presença de microrganismo conjuntivo, pool de microorganismos, pool de bactérias, dados de *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

O grupo 4-NQO demonstrou correlação positiva entre pool de microorganismos e pool de bactérias (0,98) e esta associação também é estabelecida com *Candida albicans* (0,81), *Enterococcus faecalis* (0,69), *Staphylococcus* sp (0,67), *Streptococcus* sp (0,55), CEC invasivo (0,87), intensidade inflamatória (0,82) e displasia grave (0,41). O CEC microinvasivo (-0,46) e a hiperplasia papilar apresentaram correlação inversa. O pool de bactérias mostra correlação positiva entre *Enterococcus faecalis* (0,74), *Saphylococcus* sp (0,71), *Candida albicans* (0,69), *Streptococcus* sp (0,62), invasivo-SCC (0,78), intensidade inflamatória (0,74) e correlação negativa entre micro-invasiva SCC (-0,57) e hiperplasia papilar (-0,51). O *Streptococcus* sp apresenta correlação positiva entre *Staphylococcus* sp (0,93), CEC invasivo (0,62), acantose (0,54), displasia leve (0,55), intensidade inflamatória (0,47) e, correlação negativa entre CEC micro-invasivo (-0,61), hiperplasia papilar (-0,62) e, displasia moderada (-0,55). A *Candida albicans* apresenta correlação positiva entre CEC invasivo (0,78) e intensidade inflamatória (0,69). O *Staphylococcus* sp apresenta correlação positiva entre CEC invasivo (0,70), CEC profundo-invasivo (0,55), acantose (0,58), displasia grave (0,58), intensidade inflamatória (0,60) e, correlação negativa entre CEC microinvasivo (-0,50) e hiperplasia papilar (-0,62) (figura 3).

O grupo de 4-NQO+8nL/g TP-4-ol demonstrou correlação positiva entre pool de microorganismos e pool de bactérias (0,49) e esta associação também é estabelecida com *Candida albicans* (0,62), *Enterococcus faecalis* (0,73) e um negativo

correlação com *Streptococcus* sp (-0,55), CEC invasivo profundo (-0,69), displasia (-0,67), displasia moderada (-0,78) e intensidade inflamatória (-0,48). O pool bacteriano apresenta correlação positiva entre *Enterococcus faecalis* (0,58), *Staphylococcus* sp (0,62), displasia leve (0,52) e correlação negativa com *Streptococcus* sp (-0,55), acantose (-0,54) e displasia moderada (-0,75). O *Streptococcus* sp apresenta correlação positiva entre CEC in situ (0,51), CEC invasivo profundo (0,52), acantose (0,58), displasia (0,63) e displasia moderada (0,68) e, correlação negativa entre *Enterococcus faecalis* (-0,47). A *Candida albicans* apresenta correlação negativa entre *Staphylococcus* sp (-0,52), CEC micro-invasivo (-0,46) e CEC profundo-invasivo (-0,64) (figura 4).

O grupo de 4-NQO+0,1nL/g TP-4-ol demonstrou correlação positiva entre pool de microrganismos e pool de bactérias (0,86) e esta associação também é estabelecida com *Candida albicans* (0,66) e *Enterococcus faecalis* (0,92). O pool de bactérias mostra correlação positiva entre *Streptococcus* sp (0,46) e *Enterococcus faecalis* (0,70). O *Streptococcus* sp apresenta correlação positiva entre CEC invasivo (0,45) e, correlação negativa entre *Candida albicans* (-0,44). A *Candida albicans* apresenta correlação positiva entre *Enterococcus faecalis* (0,59), inflamação aguda (0,44), intensidade inflamatória (0,44) e, correlação negativa entre *Streptococcus* sp (-0,44). O *Staphylococcus* sp apresenta correlação negativa entre CEC microinvasivos (-0,48) (figura 5).

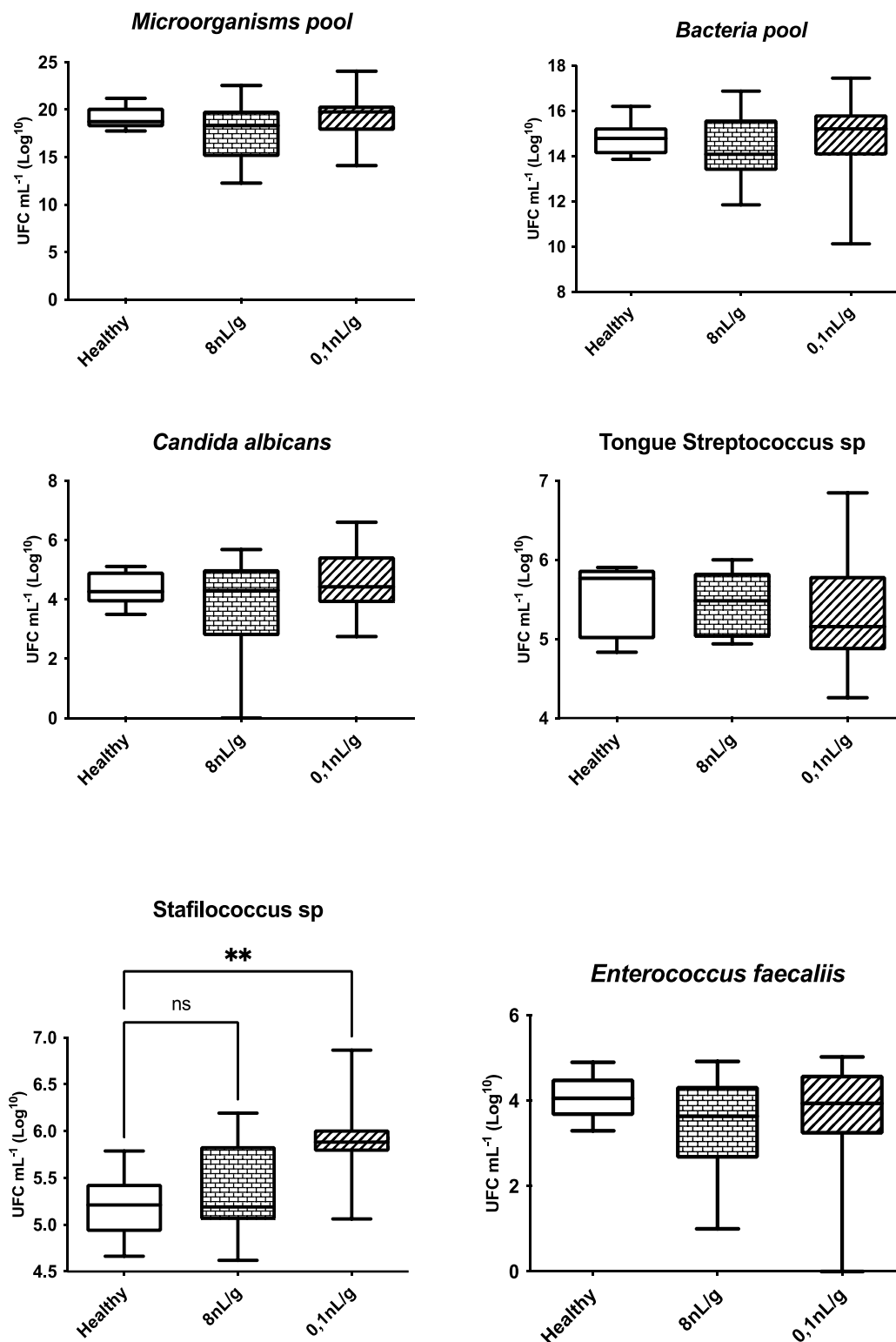
O pool de microrganismo foi correlacionado com microrganismo superficial (1,00), tipo agudo de infiltrado inflamatório (1,00), pool de bactérias (0,79), *Candida albicans* (0,72) e *Enterococcus faecalis* (0,79). Da mesma forma o pool de bactérias apresentou correlação com *Enterococcus faecalis* (0,78).

O CEC in situ apresentou correlação com displasias (0,46) e displasia leve (0,54). A displasia apresentou correlação com displasia moderada (0,83). A displasia grave apresentou correlação com microrganismos conjuntivos (0,44). O infiltrado inflamatório agudo foi correlacionado ao microrganismo superficial (1,00).

A displasia moderada apresentou correlação estatística com *Staphylococcus* sp. O número de UFC/mL diminui na displasia moderada ($P<0,05$). Da mesma forma, as diversas displasias apresentaram correlação estatística com a ferramenta bacteriana, a UFC/mL aumentou ($P<0,05$). O CEC in situ demonstrou redução de *Staphylococcus* sp UFC/mL ($P<0,05$). O inverso foi observado para CEC invasivo profundo que mostra incremento de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* ($P<0,05$). Por

outro lado, o infiltrado de intensidade inflamatória associado ao CEC demonstrou incremento de UFC/mL de *Streptococcus* sp($P < 0,05$).

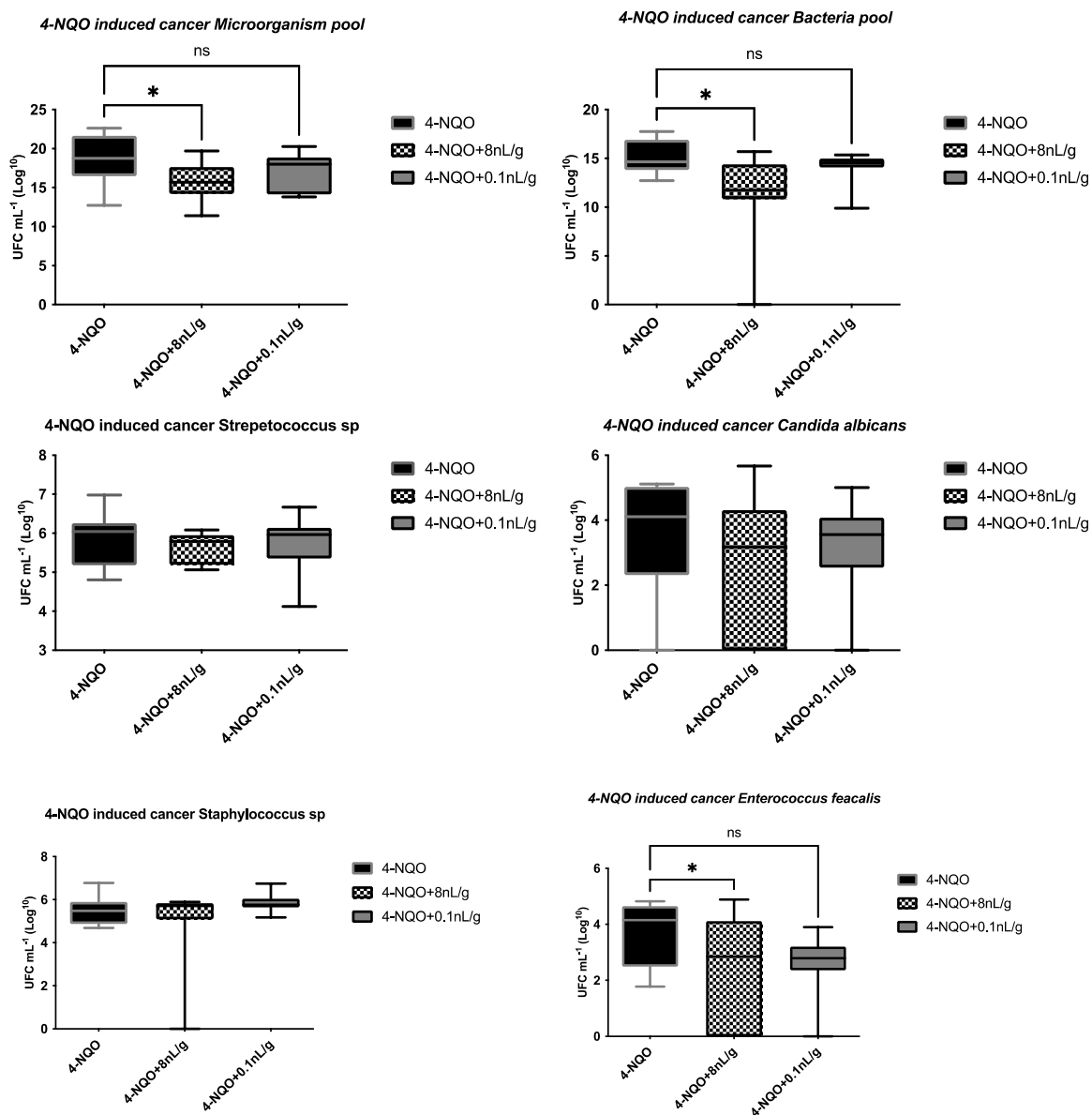
Figura 1 - Gráfico de box plot com perfil microbiano oral (UFC/mL), ratos saudáveis em 8nL/g e 0,1nL/g de Terpinen-4-ol [-] por gavagem oral



Pool de microrganismos e isolados de Streptococcus sp, Candida albicans, Staphylococcus sp e Enterococcus faecalis (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; **** P<0,0001 ou ns=não significativo).

Fonte: Elaboração própria.

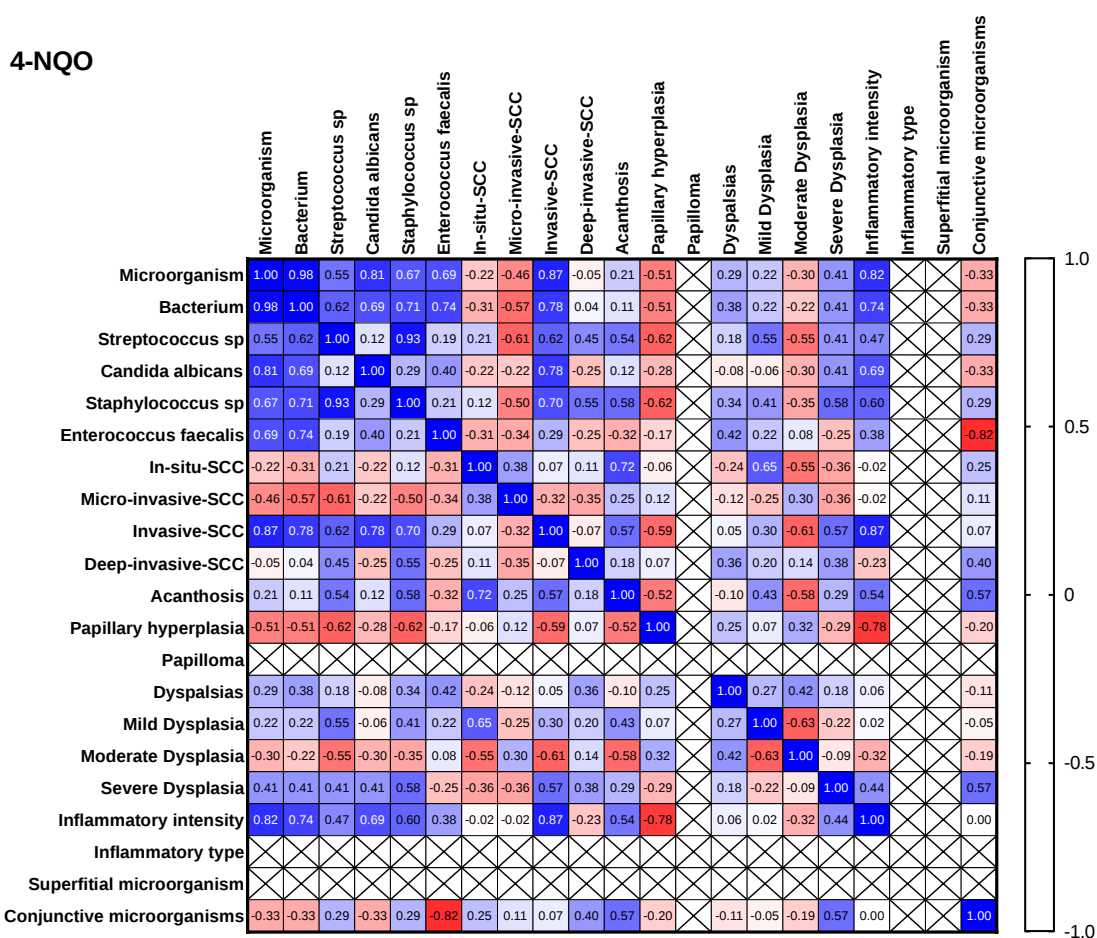
Figura 2 - Gráfico de box plot de ratos induzidos por câncer oral 4-NQO (25ppm) tratados com 8nL/g e 0,1nL/g de Terpinen-4-ol [-] em gavagem oral



Pool de microrganismos e isolados de *Streptococcus* sp, *Candida albicans*, *Staphylococcus* sp e *Enterococcus faecalis*(*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001;**** P<0,0001 ou ns=não significativo) .

Fonte: Elaboração própria.

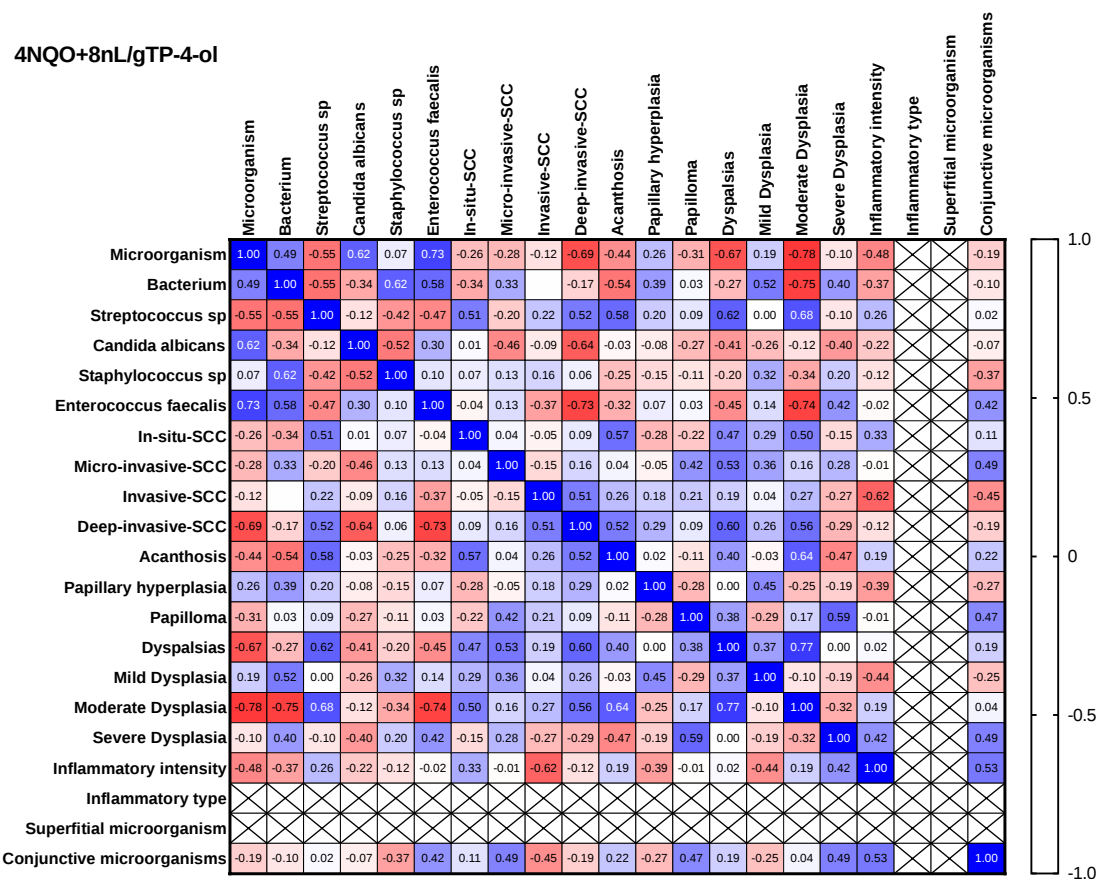
Figura 3 - Gráfico de calor da correlação de Pearson entre alterações histopatológicas no tecido lingual após indução de carcinogênese lingual de ratos por 4-NQO (25ppm) e perfil de cultura microbiana oral



A cor azul representa a correlação positiva, a cor branca a correlação nula e a cor vermelha a correlação negativa ($P < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Gráfico de calor da correlação de Pearson entre alterações histopatológicas no tecido lingual após indução de carcinogênese lingual de ratos por 4-NQO (25ppm)+8nL/g TP-4-ol e perfil de cultura microbiana oral

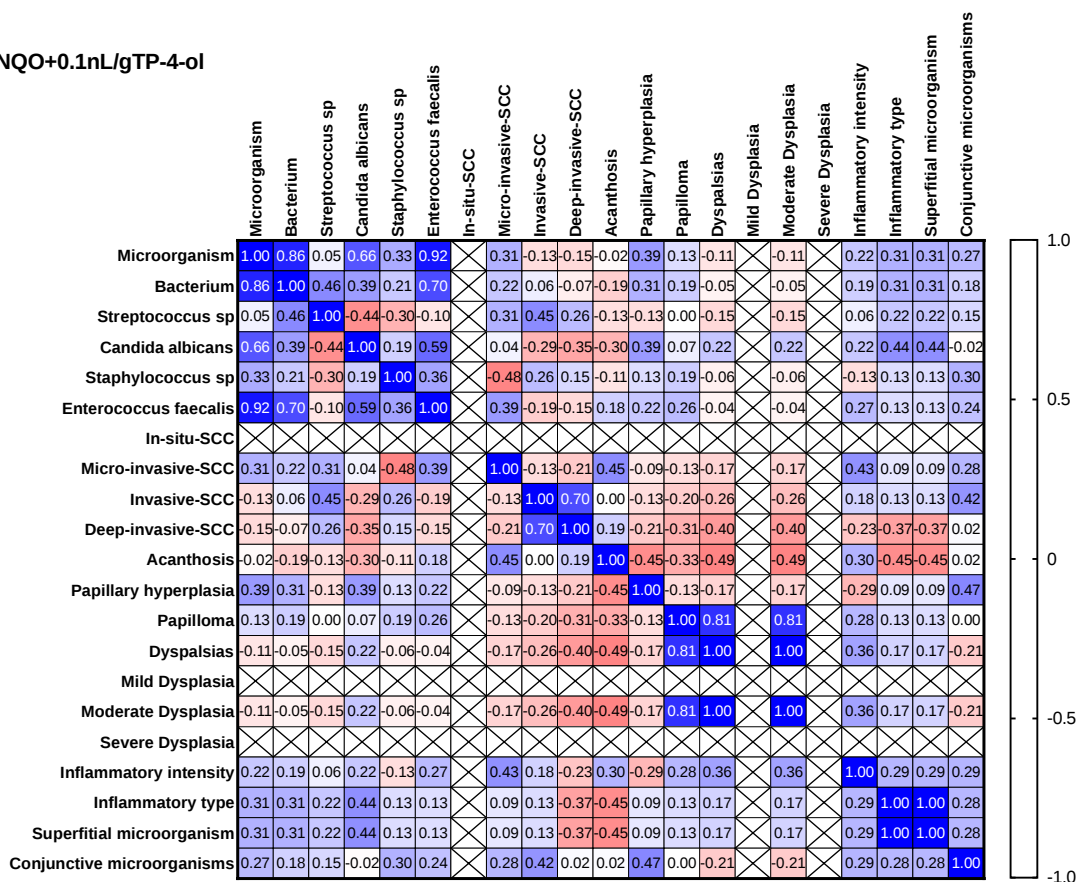


A cor azul representa a correlação positiva, a cor branca a correlação nula e a cor vermelha a correlação negativa ($P < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Gráfico de calor da correlação de Pearson entre alterações histopatológicas no tecido lingual após indução de carcinogênese lingual de ratos por 4-NQO (25ppm)+0.1nL/g TP-4-ol e perfil de cultura microbiana oral

4NQO+0.1nL/gTP-4-ol



A cor azul representa a correlação positiva, a cor branca a correlação nula e a cor vermelha a correlação negativa ($P < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O efeito da exposição crônica de Terpinen-4-ol à microbiota oral de ratos não foi previamente descrito em ratos saudáveis ou induzidos por câncer 4-NQO. A gavagem oral de 8nL/g de Terpinen-4-ol em uso crônico reduziu o pool de microbiota oral ($P<0,05$) e o pool de bactérias ($P<0,05$) em ratos induzidos por 4-NQO e o *Enterococcus faecalis* foi principalmente reduzido ($P<0,05$). A Correlação entre microrganismos orais, alterações displásicas e carcinoma lingual foi verificada em ratos induzidos por 4-NQO. O grupo saudável apresenta aumento de *Staphylococcus* sp tratado com 0,1nL/g de Terpinen-4-ol ($P<0,01$).

O óleo de melaleuca alternifolia (TTO) contém 40,3% de Terpinen-4-ol e demonstrou atividade antimicrobiana in vitro contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*⁷⁴ e a análise in vitro de TP-4-ol demonstraram atividade antibacteriana.⁷⁵ relataram a inibição da adesão à superfície de esmalte e dentina de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophil* em biofilme. Maquera-Huacho et al., 2018⁷⁶ descreveram in vitro a atividade antibacteriana de TP-4-ol para *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* na superfície do implante de titânio. Maquera Huacho et al, diminuiu o biofilme de espécie única de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius* e *Actinomyces viscosus* e multiespécies *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 24 e 48 horas de posição de superfícies de implantes de hidroxiapatita e titânio⁷⁷.

De fato, o terpinen-4-ol apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* por uma diminuição na síntese da parede celular bacteriana e, o terpinen-4-ol exibiu inibição de quorum sensing (QS) e regulou negativamente todos os principais genes QS em *Pseudomonas aeruginosa*^{78,79}. Sinergismo com cefazolina, oxacilina e meropenem. Foi descrita atividade antibiofilme para uso em soluções tópicas orais⁷⁸. Outros outros, TP-4-ol não apresentou atividade antimicrobiana no biofilme de *Candida albicans*⁸⁰.

Nossos resultados descreveram um aumento de *Staphylococcus* sp em animais saudáveis cronicamente expostos a 0,1nL/g de TP-4-ol[-]. Uma exposição crônica da droga pode ser um microrganismo resistente selecionado e, nossos dados descreveram isso na menor concentração de TP-4-ol. Por outro lado, a menor

concentração diminui *Enterococcus faecalis* no biofilme oral de ratos induzidos por 4-NQO.

Nossa atividade antimicrobiana em pool de microorganismos, pool de bactérias, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus* sp é semelhante aos resultados in vitro de Hammer and Heel (2012) descreveram o efeito antimicrobiano do TP-4-ol induzindo danos na membrana com diminuição da polaridade e aumento da permeabilidade em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* ⁸¹. Observamos correlação negativa entre *Staphylococcus* sp e carcinoma in situ e displasia moderada, mas nenhuma correlação com carcinoma induzido geral.

Guo ⁸², descreveram uma correlação negativa entre o pool de bactérias e câncer oral, mas uma associação positiva de câncer com *Staphylococcus* e uma associação negativa de câncer com *Enterococcus*. Eles também descreveram uma associação positiva entre câncer e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8) e IL-1 β ⁸². Nosso câncer oral induzido por 4-NQO mostra uma correlação positiva entre infiltrado inflamatório agudo e câncer de língua e *Streptococcus* sp. Por outro lado, verificamos uma correlação positiva entre displasia grave e pool de bactérias e, entre carcinoma lingual profundamente invasivo e *Enterococcus faecalis*. Um estudo de câncer bucal humano descreveu a predominância de *Streptococcus* sp, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus* sp ⁸³.

Na análise de correlação que observamos, o pool de bactérias mostra uma correlação positiva entre o CEC invasivo (0,78) e uma correlação negativa entre o CEC micro-invasivo (-0,57). O *Streptococcus* sp mostra uma correlação positiva entre *Staphylococcus* sp (0,93), CEC invasivo (0,62), e uma correlação negativa entre CEC micro-invasivo (-0,61), hiperplasia papilar (-0,62) e displasia moderada (-0,55). Esses resultados estariam associados à progressão da carcinogênese. Isso sugere a possibilidade de usar análises desses microrganismos como um marcador útil para identificar a presença de câncer em um modelo 4-NQO.

De fato, outro estudo mostrou à *Candida albicans* uma correlação positiva entre o CEC invasivo. Satiman ⁸⁴, relataram que o gene ECE1 (candidalisina) está implicado na oncogênese do epitélio do hospedeiro do câncer, contribuindo para a progressão da carcinogênese no CEC ⁸⁴. Além disso, em estudo de Máté Vadovics ⁸⁵, expor a *Candida albicans* potencializa a progressão do carcinoma espinocelular oral in vitro e in vivo. Além disso, PP Dwivedi ⁸⁶, mostraram que *C. albicans* desempenha um papel na promoção da displasia oral em um modelo de infecção em camundongos quando

o 4NQO foi usado como iniciador de neoplasia oral. Apesar de observarmos em nosso estudo, correlação negativa entre displasia e *Candida albicans*, mas correlação positiva com CEC invasivo em ratos (0,78).

Porém, não há estudo na literatura que aborde a correlação entre estreptococos, estafilococos, enterococos e CEC em ratos. A literatura aborda a correlação da progressão do CEC em humanos. No entanto, em nosso estudo foi observado que *Staphylococcus* sp apresenta uma correlação positiva entre CEC invasivo (0,70), CEC invasivo profundo (0,55) e displasia grave (0,58). Uma correlação negativa entre o CEC micro-invasivo (-0,50). Os animais tratados com TP-4-ol, 0,1nL/g e 8nL/g, demonstraram uma redução da associação de displasia dos microrganismos descritos e associação de câncer que foi compatível com a redução da indução de câncer descrita anteriormente por nós. Wang 2019⁸⁷ descreveu *Staphylococcus aureus* induzindo a promoção do tumor COX-2 na transformação maligna de queratinócitos orais.

Além disso, o pool de bactérias mostra uma correlação positiva entre o CEC invasivo (0,78) e uma correlação negativa entre o CEC micro-invasivo (-0,57). O *Streptococcus* sp mostra uma correlação positiva entre *Staphylococcus* sp (0,93), CEC invasivo (0,62), e uma correlação negativa entre CEC micro-invasivo (-0,61), hiperplasia papilar (-0,62) e displasia moderada (-0,55). Por outro lado, Sakamoto et al., descreveram *Streptococcus* como os isolados mais comuns de linfonodos cervicais em pacientes com câncer bucal, sendo um marcador especialmente relevante do câncer de cabeça, pescoço e esôfago. Mager¹⁷ descreveram o aumento de *Streptococcus* na saliva de pacientes com CEC. Essas espécies foram sugeridas como marcador diagnóstico e um status preditivo de 80% foi descrito para casos de câncer. A lesão potencialmente maligna também foi associada a *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Parvimonas* sp., *Peptostreptococcus* sp. e *Slackia* sp no estudo de Nagy et al.¹⁸ descreveram pool de bactérias potencializadas em carcinomas de células escamosas, sendo o *Enterococcus* o principal microrganismo. Shibata descreveu a superexpressão de COX-2 como correlacionada à displasia oral grave.

O mecanismo de associação do microrganismo ao CEC invasivo e invasivo profundo e diversas displasias precisam ser estudados. Acreditamos que pool de microrganismos (0,87), pool de bactérias (0,78), *Candida albicans* (0,78) e *Staphylococcus* sp (0,70) são preditivos da presença de CEC invasivo e

Staphylococcus sp é preditivo da presença de displasia moderada em 4-NQO ratos induzidos.

7 CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

1. U.S.Census Bureau: World POPClock Projection [Web Page]. Washington, DC: Department of Commerce; 2020 [acesso em 2021 10 nov.]. Disponível em: <http://www.census.gov/population/popclockworld.html>.
2. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012; 13(8): 790-801.
3. Global Cancer Observatory [Web Page]. International Agency for Research on Cancer: World Health Organization; 2020; [acesso em 2021 10 nov]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>.
4. Carreras-Torras C, Gay-Escoda C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 May 1;20(3):305-15
5. M. Braakhuis, C. Rene´ Leemans, and Ruud H. Brakenhoff. A Genetic Progression Model of Oral Cancer : Current Evidence and Clinical Implications. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33: 317–22.
6. Warnakulasuriya, Saman. Global Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancer. *Oral Oncology* 45 (4–5). 2009; 309–16.
7. La Vecchia C, A Tavani, S Franceschi, F Levi, G Corrao, and E Negri. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. *Oral Oncology*. 1997; 33 (5): 302–12.
8. Lewin F, S E Norell, H Johansson, P Gustavsson, J Wennerberg, A Biörklund, and L E Rutqvist. Smoking Tobacco, Oral Snuff, and Alcohol in the Etiology of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Population-Based Case-Referent Study in Sweden. *Cancer*. 1998; 82 (7): 1367–75.
9. Liang, Xin-Hua, Jason Lewis, Robert Foote, David Smith, and Deepak Kademani. Prevalence and Significance of Human Papillomavirus in Oral Tongue Cancer: The Mayo Clinic Experience. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2008;66 (9): 1875–80.
10. Nemoto RP, Victorino AA, Pessoa GB, Cunha LLG, Silva JAR, Kanda JL, et al. Oral cancer preventive campaigns: are we reaching the real target? *Braz Othorinolaryngol*. 2015; 81(1): 44-9.
11. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral cancer. *Dent Clin N Am*. 2014; 58(2): 315-40.
12. Meurman JH. Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol*. 2010; 10 (2): 1-10.
13. Rajeev R, Choudhary K, Panda S, Gandhi N. Role of bacteria in oral carcinogenesis. *South Asian J Cancer*. 2012;1:78-83.
14. Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from-secondary amines by E. coli strains. *Carcinogenesis* 1985;6:911-5 8: 245-8.

15. Sasaki M, Yamaura C, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T, et al. Streptococcus anginosus infection in oral cancer and its infection route. *Oral Diseases* 2005;11:151-6.
16. Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2010;31:126-31.
17. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med.* 2005, 7;3:27.
18. Nagy K, Sonkodi I, Szoke I, et al. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol.* 1998; 34: 304–8.
19. Anand D, Vineeta S, Mridula S, Royana S, Manoj P. Helicobacter pylori and oral cancer: possible association in a preliminary case control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12:1333-6.
20. Fernando N, Jayakumar G, Perera N, Amarasingha I, Meedin F, Holton J. Presence of Helicobacter pylori in betel chewers and non betel chewers with and without oral cancers. *BMC Oral Health* 2009;9:23.
21. Rajendran R, Rajeev R, Anil S, Alasqah M, Rabi AG. Helicobacter pylori coinfection is a confounder, modulating mucosal inflammation in oral submucous fibrosis. *Indian J Dent Res* 2009;20:206-11.
22. Tateda M, Shiga K, Saijo S, Sone M, Hori T, Yokoyama J, et al. Streptococcus anginosus in head and neck squamous cell carcinoma: Implication in carcinogenesis. *Int J Mol Med.* 2000;6:699-703.
23. Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000; 36: 272-6.
24. Schmidt BL, Kuczynski J, Bhattacharya A, Huey B, Corby PM, Queiroz EL, Nightingale K, Kerr AR, DeLacure MD et al. Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One.* 2014;9(8):e106297.
25. Wang L, Ganly I. The oral microbiome and oral cancer. *Clin Lab Med.* 2014; 34(4): 711-9.
26. He Q, Chen Z, Cabay RJ, Zhang L, Luan X, Chen D, et al. microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. *Oral Oncol.* 2016; 57:15-20.
27. Bundela S, Sharma A, Bisen PS. Potential compounds for oral cancer treatment: Resveratrol, Nimbolide, Lovastatin, Bortezomib, Vorinostat, Berberine, Pterostilbene, Deguelin, Andrographolide, and Colchicine. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141719.
28. Saba NF, Haigentz M Jr, Vermorken JB, Strojan P, Bossi P, Rinaldo A, et al. Prevention of head and neck squamous cell carcinoma: removing the "chemo" from "chemoprevention". *Oral Oncol.* 2015;51(2):112-8.
29. William WN Jr, Papadimitrakopoulou VA. Optimizing biomarkers and endpoints in oral cancer chemoprevention trials. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013;6(5):375-8.

30. Shrotriya S, Agarwal R, Sclafani RA. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol.* 2015;815:333-48.
31. de Groot AC, Schmidt E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. *Contact Dermatitis.* 2016;75(3):129-43.
32. Pino JA, Marbot R, Fuentes V. Characterization of volatiles in bullock's heart (*Annona reticulata* L.) fruit cultivars from Cuba. *J Agric Food Chem.* 2003;51(13):3836-9.
33. Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Różalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol.* 2011;60(1):35-41.
34. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Moon SE, Kil BS, Yun SI, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytother Res.* 2007;21(3):295-9.
35. Yang C, Zhou LL, Wang HY, Huang SN, Liu Q, Hu SL, et al. The inhibitory effect of *Zingiber corallinum* Hance essential oil on drug-resistant bacteria and evaluation of its acute toxicity. *Med Sci Monit.* 2011;17(5):BR139–46.
36. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Biomed Res Int.* 2015;2015:590470.
37. Baldissera MD, Grando TH, Souza CF, Gressler LT, Stefani LM, da Silva AS, et al. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol.* 2016;162:43-8.
38. Garozzo A, Timpanaro R, Stivala A, Bisignano G, Castro A. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action. *Antiviral Res.* 2011;89(1):83-8.
39. Maia-Joca RP, Joca HC, Ribeiro FJ, do Nascimento RV, Silva-Alves KS, Cruz JS, et al. Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. *Life Sci.* 2014;115(1-2):52-8.
40. Lahlou S, Interaminense LF, Leal-Cardoso JH, Duarte GP. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17:323–30.
41. Nóbrega FF, Salvadori MG, Masson CJ, Mello CF, Nascimento TS, Leal-Cardoso JH, et al. Monoterpenoid terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:703848.
42. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
43. Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P, Angioni A. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2007;55(17):7093-8.

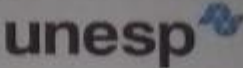
44. Shapira S, Pleban S, Kazanov D, Tirosh P, Arber N. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156540.
45. Wu CS, Chen YJ, Chen JJ, Shieh JJ, Huang CH, Lin PS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:818261.
46. McCormick DL, Phillips JM, Horn TL, Johnson WD, Steele VE, Lubet RA. Overexpression of cyclooxygenase-2 in rat oral cancers and prevention of oral carcinogenesis in rats by selective and nonselective COX inhibitors. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; 3(1): 73-81
47. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19:
48. Salén JCW. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kesel ML. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. 3ed. Boston: CRC Press; 1995.
49. Lynette AH. *Responsible conduct with animals in research*. England: Oxford Univ. Press; 1998.
50. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):301–13.
51. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006; 42(7): 655-67.
52. Fujino H, Chino T, Imai T. Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *Journal of the National Cancer Institute*. 1965; 35(6): 907-18.
53. Wallenius K, Lekholm U. Oral Cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontologisk Revy*. 1973; 24: 39-47.
54. Sun Z, Guan X, Li N, Liu X, Chen X. Chemoprevention of oral cancer in animal models, and effect on leukoplakias in human patients with ZengShengPing, a mixture of medicinal herbs. *Oral Oncol*. 2010; 46(2): 105-10.
55. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras*. 2004;19(4):441-7.
56. Gaetti-Jarfim, E. C. et al. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. *Revista Odontológica de Araçatuba, Araçatuba*, v. 31, n. 2, p.09- 13, dezembro, 2010.
57. Gupta, K.; Metegurd, R. Evidences Suggesting Involvement of Viruses in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology Research International, India*, v. 7, n. 4, p.321- 332, out. 2013.
58. Antunes AA, Antunes AP, Silva PV, Avelar RL, Santos TS. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2007;36(3):152-4.
59. Kalavrezos N, Scully C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866-8, 871-4, 877.

60. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 5: risk factors (other). *Dent Update*. 2015;42(8):766-8, 71-2, 75-6.
61. Murphy J, Berman DR, Edwards SP, Prisciandaro J, Eisbruch A, Ward BB. Squamous cell carcinoma of the tongue during pregnancy: a case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016; 74(12): 2557-66.
62. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*. 2011; 29(11):1488–94.
63. Santos-Silva AR, Carvalho Andrade MA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, Lopes MA. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(1):103-7.
64. Stanko P, Poruban D, Mracna J, Holly D, Janicek B, Pinakova Z, et al. Squamous cell carcinoma and piercing of the tongue - a case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(4):329-31
65. He Q, Chen Z, Cabay RJ, Zhang L, Luan X, Chen D, et al. microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. *Oral Oncol*. 2016;57:15-20.
66. Krishnatreya M, Nandy P, Rahman T, Sharma JD, Das A, Kataki AC, et al. Characteristics of oral tongue and base of the tongue cancer: a hospital cancer registry based analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(4):1371-4.
67. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 6: potentially malignant disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866-8, 71-4, 77.
68. Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*. 2014; 27;10(3):e1003933.
69. Yamamoto V, Gacek RRF. Microbiota oral de ratos e camundongos: estudo da prevalência de bactérias gram positivas. *RESBCAL*. 2012; 1(4): 302-309.
70. Porto SMMS, Viana MT, Silva KMF, Diniz MFA, Castro CMMB. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. *Rev. Nutr*. 2007; 20 (6): 625-632.
71. Avgoustidis D, Nisyrios T, Nkenke E, Lijnen R, Ragos V, Perrea D, et al. Oral carcinogenesis is not achieved in different carcinogen-treated PAI-1 transgenic and wild-type mouse models. *In Vivo*. 2012;26(6):1001-5.
72. Pereira TS, de Sant'anna JR, Silva EL, Pinheiro AL, de Castro-Prado MA. In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(2):852-7.
74. Borotová P, Galovičová L, Vukovic NL, Vukic M, Tvrdá E, Kačániová M. Chemical and Biological Characterization of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. *Plants (Basel)*. 2022 Feb 20;11(4):558.
75. Bordini EAF, Tonon CC, Francisconi RS, Magalhães FAC, Huacho PMM, Bedran TL, Pratavieira S, Spolidorio LC, Spolidorio DP. Antimicrobial effects of terpinen-4-ol against oral pathogens and its capacity for the modulation of gene expression. *Biofouling*. 2018 Aug;34(7):815-825.

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

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

ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS



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



CERTIFICADO

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

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



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - Fone (16) 3301-6439 / Fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@fod.unesp.br - home page: <http://www.fod.unesp.br>

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos a data da defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara 08 de Setembro de 2022

Caroline Camizotti Guerra