



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA - *Campus* Sobral**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MYKELLY GOMES ALVES**

**ESTUDO DE TOXICIDADE, DOCKING MOLECULAR E EFEITO DO SM-2 EM  
MODELO PRÉ-CLÍNICO NO CÂNCER DE LÍNGUA EM CAMUNDONGOS.**

**Sobral – CE**

**2023**

**MYKELLY GOMES ALVES**

**ESTUDO DE TOXICIDADE, DOCKING MOLECULAR E EFEITO DO SM-2 EM  
MODELO PRÉ-CLÍNICO NO CÂNCER DE LÍNGUA EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Medicina 2 – Subárea: Parasitologia. Linha de Pesquisa: Inflamação e Dor. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves. Coorientadora: Dr.<sup>a</sup>. Graziella Rigueira Molska.

**Sobral – CE**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G615e Gomes Alves, Mykelly.

ESTUDO DE TOXICIDADE, DOCKING MOLECULAR E EFEITO DO SM-2 EM MODELO PRÉ-CLÍNICO NO CÂNCER DE LÍNGUA EM CAMUNDONGOS. / Mykelly Gomes Alves. – 2023.

70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Helliada Vasconcelos Chaves.

Coorientação: Profa. Dra. Graziella Rigueira Molska.

1. *Stemodia maritima*. 2. Toxicidade aguda. 3. Docking molecular. 4. 4NQO. 5. Câncer de língua. I.  
Título.

CDD 610

---

**MYKELLY GOMES ALVES**

**ESTUDO DE TOXICIDADE, DOCKING MOLECULAR E EFEITO DO SM-2 EM  
MODELO PRÉ-CLÍNICO NO CÂNCER DE LÍNGUA EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Medicina 2 – Subárea: Parasitologia. Linha de Pesquisa: Inflamação e Dor. Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helliada Vasconcelos Chaves. Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Graziella Rigueira Molska.

Aprovada em: 26/04/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Helliada Vasconcelos Chaves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* de Sobral

---

Dr.<sup>a</sup> Graziella Rigueira Molska (Coorientadora)  
Universidade de Toronto - Canadá

---

Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves  
Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

---

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa  
Centro Universitário INTA- UNINTA - *Campus* Sobral

## DEDICATÓRIA

A minha filha amada, Annike Marina Alves Correa, mesmo sem ter a noção, foi a pessoa que mais me deu força para continuar buscando realizar todos os meus sonhos. Todas as vezes que rezei, foi no carinho dos seus abraços que a

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por todos os momentos desde do início dessa longa jornada que parecia não ter mais um fim. Até quando eu pensava que não suportaria esse processo, nos momentos de tristeza e alegrias. Só Deus para me fazer compreender o COVID-19, concluir o mestrado mesmo com todos os entes e conhecidos queridos que partiram na pandemia de 2020 a 2022. Aos que se foram saudades e gostaria de compartilhar essa vitória com vocês em vida, mas dedico "*in memories*".

Quero agradecer especialmente ao meu pai Emerson Filho, minha mãedrastra Karine Arcanjo e minha irmã caçula Héloa Arcanjo pelo apoio emocional durante o período que eu e a Annike vivemos com vocês. Além de todo apoio financeiro prestado. Também agradeço a Luziane e a "irmã" Eliete, que me ajudaram com a Annike e isso foi muito importante para eu conciliar meus estudos e o maior de todos os meus desafios que é a maternidade. Os dias foram mais suaves com vocês e a vida me surpreendeu com a oportunidade de conviver com todos dessa família muito obrigada pelo apoio e aconchego nesse momento, foi bom estar com vocês em Sobral.

Agradecimento especial para minha mãe Ivânia Gomes, minha irmã Érika, meu irmão Vítor Alex por todo carinho e apoio. Ao meu primo Douglas que esteve comigo desde a seleção do mestrado até a perda do voo na volta para Amazonas, juntos temos muitas histórias a contar. Ao meu sobrinho Pedro Vinícius, minhas sobrinhas Paola e Heloísa e aos demais membros da minha família materna e à família paterna que mesmo a distância me apoiaram.

Ao Joilton de Freitas Correa, com quem eu tenho uma história de vida e uma princesa, a nossa filha Annike Marina. Agradeço pelo apoio para que eu pudesse viver esse sonho que eu deixei adormecido por um tempo. O desafio foi grande de estarmos vivendo a distância e você aceitou mesmo com saudade, aguentou firme. Então, eu ti agradeço por tudo e também a todos os membros da família Freitas e Correa.

Ao meu amigo Guilherme Mendes de Prado que sempre foi prestativo em me ajudar. Carinhosamente foi de mestrando para "IC" dos "ICs" do LAFS, só para eu ter o apoio dele nos experimentos, sempre presente quando eu precisei. Meu muito obrigada por ser como você é. Aos amigos que o mestrado me deu: Manoel, Tiago, Sarah, Emerson, Nayara Alves, Maria Ester, Trycia, Karriane, Pedro Isac, Pedro Wherton, Ana Luize e todos os alunos de iniciação científica que colaboram com o projeto pela dedicação e disposição.

A minha amiga, irmã de coração e comadre: Luciane Carvalho, por todo apoio e amizade. Agradeço também a todos os (as) meus (as) amigos (as) presentes na minha vida, que me acompanharam mesmo a distância e torceram por mim. Em especial agradeço as Prof.<sup>a</sup>(s): Waldireny Gomes, Lays Alcoforado e a Vanessa Gaspareto pelos ensinamentos e o apoio.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI por todo o suporte para a confecção do material histológico. À Flávia de Araújo Silva, que era a técnica do NEMPI, por toda ajuda prestada para confecção das lâminas histopatológicas e acolhimento. À professora Dra. Karuza Maria Alves Pereira pela valiosa contribuição nas análises histopatológicas, pela disponibilidade e seu trabalho na avaliação das amostras histopatológicas.

Ao Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) - UFC. Aos profs. Geraldo Francisco e Jair Mafezoli, pela parceria no desenvolvimento dos derivados semissintéticos. A prof.<sup>a</sup> Roberta Jeane Bezerra Jorge e o colaborador Helyson Lucas, pela parceria no *Docking* molecular dos compostos e apoio.

À Alana Godinho, veterinária do biotério da UFC/Sobral. Por ser essa profissional maravilhosa e uma amiga. Por todos os ensinamentos, assim, como a Jordânia Marques que sempre que precisei esteve disposta a ajudar.

A minha orientadora Hellíada Chaves por todo empenho em me ajudar no desenvolvimento do projeto. Aos professores (as): Mirna, Vicente, Nuno. Aos funcionários e todos os (as) professores (as) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do *campus* Sobral-UFC. E as pessoas que me apoiaram de alguma maneira por contribuírem no desenvolvimento da pesquisa e meu crescimento profissional.

A minha Coorientadora Graziella Molska, e ao meu supervisor no Canadá o prof. Marco Magalhães, pelos ensinamentos, oportunidade. As pessoas maravilhosas como: Thamyris Carvalho, Karina Carneiro, Huiling Yeo, Cristiane Duque, Tâmara Araújo, dentre outros (as), que me ajudaram durante o período da mobilidade acadêmica no Canadá, com o meu projeto na Universidade de Toronto (UofT) e acolhimento para o meu desenvolvimento pessoal e profissional como pesquisadora durante a mobilidade acadêmica.

À CAPES, ao CNPQ, UFC, UofT e à FUNCAP pelo suporte financeiro.

Nem sempre terás o que desejas, mas enquanto estiveres ajudando aos outros encontrarás os recursos de que precisas.

**Chico Xavier.**



## RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) revela que uma grande parte da população mundial, entre 60% e 80%, já utilizou medicamentos à base de plantas para o tratamento de diversas doenças. *Stemodia maritima* Linn (*S. maritima*) é uma planta conhecida como matruz-bravo ou melosa e usada para diferentes aplicações por populares da área litorânea do nordeste brasileiro. A *S. maritima* e derivados estemodanos têm sido alvos de estudos devido à sua estrutura química rara e compostos bioativos. Pesquisas com Sm-1, isolado das folhas da *S. maritima*, demonstraram sua atividade analgésica, gastroprotetora, bactericida e citotóxica. A partir de Sm-1 foram desenvolvidos dois derivados semissintéticos estemodanos com potencial biológico: SM-2 e SM-3. O objetivo do presente trabalho é estudar a toxicidade, alvos moleculares por docking molecular e o efeito de SM-2 em modelo pré-clínico no câncer de língua em camundongos. Para avaliação da Toxicidade aguda, usou-se SM-2 na dose de 2000 µg/kg baseado no protocolo da OECD nº425 em camundongos *Swiss* (machos e fêmeas). Além disso, o estudo incluiu análises de *Docking* molecular do SM-2, utilizando softwares específicos para a análise *in silico* das estruturas proteicas de várias moléculas-alvo ligante, tais como: TNF- $\alpha$  (PDB: 1TNF), 1L-1 $\beta$  (PDB: 1ITB), HO-1 (PDB: 1N3O), iNOS (PDB: 3NQS), Receptor TRPV1 (PDB: 5IS0), Receptor P2X7 (PDB: 5U1W) e receptores opioides: Mu ( $\mu$ ) (PDB: 4DK1), Kappa ( $\kappa$ ) (PDB: 4DJH) e Delta ( $\delta$ ) (PDB: 6PT3) alvos ligantes com potencial farmacocinético. No estudo em questão, foi conduzida uma outra investigação do composto SM-2 em um modelo *in vivo* utilizando camundongos C57/BL6, (machos e fêmeas) com uso da substância química 4-nitroquinolina (4-NQO), um agente indutor do câncer de células escamosas na língua (CCE). Os animais receberam o 4-NQO por 10 semanas, e, após 8 semanas de suspensão do 4-NQO, foram iniciados o tratamento com SM-2 (via oral ou tópico na língua) durante 12 semanas consecutivas. O protocolo teve duração total de 32 semanas, até eutanásia dos animais. No estudo de toxicidade, o SM-2 não alterou comportamento dos animais nem apresentou toxicidade grave ou capaz de causar alguma lesão irreversível nos órgãos na dose de 2000 µg/Kg (v.o.). Não ocorreu variação no peso dos órgãos analisados dos animais machos ou fêmeas que receberam SM-2 quando comparados aos grupos controles salina (machos e fêmeas). O docking molecular mostrou que SM-2 tem afinidade com todos os alvos estudados no teste *in silico*. Na avaliação do efeito no câncer de língua, a análise histopatológica da língua demonstrou que o grupo de animais que recebeu o SM-2 (via oral e tópico), após as 12 semanas consecutivas de tratamento, apresentaram casos de displasia leve (66,7% - 0%), displasia alto (33,3%-90%) e CCE (0% - 10%), nos grupos com tratamento quando comparados ao grupo controle 4NQO sem tratamento com SM-2, que apresentou casos de displasia grau leve (0%), displasia grau alto (44,4%) e a invasão do CCE (55,5%) n=9.. E a análise dos dados estatísticos foram analisados pelo *Shapiro-Wilk*, pós-teste o teste de *Tukey* e de *Games-Howell* e T test *Mann Whitney (nonparametric)* para a ANOVA (p-valor < 0,05). Dessa forma, o SM-2 mostrou que pode ser uma alternativa para novos estudos pré-clínico com uso de modelos animais, contribuindo com uma nova opção terapêutica no tratamento do câncer de língua com foco na bioprospecção de um novo produto farmacológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Stemodia maritima*, Toxicidade aguda, *Docking* molecular, 4NQO, Câncer de língua.

## ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) reveals that a large part of the world's population, between 60% and 80%, has already used herbal medicines to treat various diseases. Products from plants generally contain fewer adverse reactions to the human body. Medicinal plants such as *S. maritima* are considered an interesting alternative for scientific studies on their medicinal potential. *Stemodia maritima* Linn is a plant called (known as matruz-bravo or melosa), used for different empirical applications in alternative medicine by people from the coastal area of northeastern Brazil in Ceará. The *S. maritima* and estemodane derivatives have been the target of study by researchers due to their rare chemical structure and bioactive compounds. In particular, a diterpene derivative called Stemodin (Sm-1), a product derived from the leaves of *S. maritima*. Research with Sm-1 demonstrated that Sm-1 has analgesic, gastroprotective, bactericidal and cytotoxic activity. From Sm-1, two other semi-synthetic stemodane derivatives with biological potential were developed: SM-2 and SM-3. The methodology of studies carried out with SM-2 in animal models with experimentation used Swiss mice (males and females) for evaluation of Acute toxicity with SM-2 at a dose of 2000 $\mu$ g/kg according to OECD protocol n<sup>o</sup>425. Furthermore, the study included molecular docking analyzes of SM-2, using specific software for the in silico analysis of the protein structures of several ligand target molecules, such as: TNF- $\alpha$  (PDB: 1TNF), 1L-1 $\beta$  (PDB: 1ITB), HO-1 (PDB: 1N3O), iNOS (PDB: 3NQS), TRPV1 Receptor (PDB: 5IS0), P2X7 Receptor (PDB: 5U1W) and opioid receptors: Mu ( $\mu$ ) (PDB: 4DK1), Kappa (K) (PDB: 4DJH) and Delta ( $\delta$ ) (PDB:6PT3) ligand targets with pharmacokinetic potential. In the study in question, another investigation of the SM-2 compound was conducted in an in vivo model using C57/BL6 mice (males and females) using the chemical substance 4-nitroquinoline (4-NQO), a cancer-inducing agent. of squamous cells on the tongue -CCE. The animals received 4-NQO for 10 weeks, and after 8 weeks of suspension of 4-NQO, treatment with SM-2 (oral and topical on the tongue) was started for 12 consecutive weeks. The protocol lasted a total of 32 weeks, until the animals were euthanized. The objective of the study was to evaluate the anti-inflammatory and antitumor potential in carcinogenesis in SCC. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The results obtained in the study with histopathological analysis of the tongue demonstrated that SM-2 may be a promising therapeutic option in the treatment of tongue cancer. And the analysis of statistical data was analyzed by Shapiro-Wilk, post-test Tukey and Games-Howell test and Mann Whitney T test (nonparametric) for ANOVA (p-value < 0.05). Therefore, research on SM-2, an stemodane derivative, reveals remarkable therapeutic potential, especially in the context of inflammation associated with tongue cancer.

**KEYWORDS:** *Stemodia maritima*, Acute toxicity, Molecular docking, 4NQO, Tongue Cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I – 1ª etapa do projeto na UFC

<b>Figura 1</b>	<i>Stemodia maritima</i> Linn.	22
<b>Figura 2</b>	Fórmula estrutural da Estemodina (1), Afidicolina (2) e 8β-hidroxiestemodina (3)	23
<b>Figura 3</b>	Exemplo do Processo de montagem <i>Docking</i> molecular	28
<b>Figura 4</b>	Curva de Sobrevivência	30
<b>Figura 5</b>	Variação do Peso Ponderal	31
<b>Figura 6</b>	Estruturas tridimensional das moléculas alvo do <i>Docking</i> molecular	37

### CAPÍTULO II– Artigo do projeto de pesquisa na UofT

<b>Figura 1</b>	Linha cronológica do protocolo experimental	45
<b>Figura 2</b>	Gráfico 2A. Análise ponderal de camundongos induzidos à carcinogênese experimental por 4NQO (via oral de SM-2)	48
<b>Figura 2</b>	Gráfico 2B. Análise ponderal de camundongos induzidos à carcinogênese experimental por 4NQO (tópico de SM-2)	48
<b>Figura 3</b>	Análise macroscópica por imagens fotográficas da lesão e análise histológica	49
<b>Figura 4</b>	Modelo experimental 4NQO	49

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Taxa de sobrevivência dos animais no ensaio de segurança de SM-2.	30
<b>Tabela 2</b>	Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança e toxicidade aguda de SM-2 na dose única de 2000 µg/Kg.	31
<b>Tabela 3</b>	Os Efeitos da de SM-2 2000 µg/kg sobre os pesos relativos dos órgãos dos camundongos machos e fêmeas ( <i>Swiss</i> ) por 14 dias.	32
<b>Tabela 4</b>	Níveis Séricos de ácido úrico, creatinina, ALT e AST de camundongos machos e fêmeas ( <i>Swiss</i> ) tratados com SM-2 por 14 dias.	33
<b>Tabela 5</b>	Efeito do tratamento com SM-2 na análise histopatológica (H & E) nos órgãos: baço, coração, estômago, rim e fígados dos animais.	33
<b>Tabela 6</b>	Propriedades físico-químicas da estrutura SM-2 (Regra dos 5 de Lipinski).	35
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i> de permeabilidade a barreiras biológicas (TGI, BHE), inibição enzimática (pGP) e metabolismo da lactona e seu derivado semissintético SM-2.	36
<b>Tabela 8</b>	Resultados de predição de Toxicidade da estrutura do SM-2.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>4NQO:</b>	4-Nitroquinolona 1-Óxido
<b>± SEM:</b>	Mais ou menos o erro padrão da média
<b>ADT:</b>	Auto Dock tools
<b>ADME</b>	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
<b>AINES:</b>	Anti-Inflamatórios não esteroidais
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ANOVA:</b>	Análise de Variância
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BH</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>CAPES:</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CCEB</b>	Carcinoma de células escamosas bucal
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CEUA</b>	Comissão Ética no uso de animais
<b>CNPq:</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>FUNCAP</b>	Fundação Cearense de apoio ao Desenvolvimento científico e tecnológico
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LABFITO</b>	Laboratório de Fitoquímica Aplicada
<b>LAFS</b>	Laboratório de Farmacologia
<b>LPM</b>	Lesões potencialmente malignas
<b>NEMPI</b>	Núcleo de Estudos em Microscopia e processamento de imagem
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>UofT</b>	Universidade de Toronto
<b>p&lt;0,05:</b>	Probabilidade de erro estatístico 5%
<b>SISGEN</b>	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<b>SPSS:</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal

## LISTA DE SÍMBOLOS

- °C: Grau Celsius
- g: Gramas
- n: Número da amostra
- mg: Miligrama
- mg/kg: Miligrama por quilo
- µg: Microgramas
- µL: Microlitros

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	Revisão bibliográfica .....	20
2.1	Plantas Medicinais na Saúde .....	20
2.1.1	Família Plantaginaceae e importância econômica .....	21
2.2	Metabólitos secundários e o gênero <i>Stemodia maritima</i> .....	21
2.2.1	<i>Stemodia maritima</i> e os derivados semissintéticos diterpênicos.....	22
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	24
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
4.1	Objetivo geral .....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	26
5.1	O Tipo de estudo, comitê de ética (CEUA) e os recursos financeiros.....	26
5.2	Ensaio de toxicidade Oral Aguda: Procedimento <i>Up and Down</i> nº425 (OECD).....	26
5.2.1	Os animais .....	27
5.2.1.1	Avaliação comportamental .....	27
5.2.1.2	Coleta de amostras biológicas.....	27
5.2.2.2	Processamento das amostras histopatológicas.....	28
5.3	<b>DOCKING MOLECULAR</b> .....	28
5.3.1	Propriedades do ADMET.....	29
5.3.1.1	O software do <i>Docking</i> Molecular do SM-2.....	29
5.3.2.1	Alvos terapêuticos analisados.....	29
5.3.2.2	Posicionamento dos encaixes do acoplamento.....	29
6	<b>RESULTADOS DOS TESTES: TOXICIDADE AGUDA E DOCKING MOLECULAR</b> .....	30

6.1	Resultado do Teste de Toxicidade Aguda do SM-2.....	30
6.1.1	Taxa de sobrevivência.....	30
6.2	Alterações comportamentais.....	31
6.2.1	Alterações do peso corporal.....	31
6.2.1.1	Alterações do peso relativo dos órgãos.....	32
6.2.1.2	Avaliação da Hepatotoxicidade das amostras séricas .....	32
6.3	Análise histopatológica.....	33
6.3.1	Resultado do <i>Docking</i> molecular .....	34
	<b>CAPÍTULO II: ESTUDO DE DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO OBTIDO DA ESTEMODINA NO CÂNCER DE LÍNGUA INDUZIDO POR AGENTE QUÍMICO EM ROEDORES .....</b>	41
	<b>REFERÊNCIAS DO ARTIGO.....</b>	54
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	58
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	59
	<b>ANEXOS DO PROJETO .....</b>	66
	<b>ANEXO I – Modelo da revista .....</b>	67
	<b>ANEXO II – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (UofT) .....</b>	69
	<b>ANEXO II – DECLARAÇÃO DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA) .....</b>	70



## 1 INTRODUÇÃO

A bioprospecção de produtos naturais para o tratamento de doenças é uma estratégia que vem sendo estudada (BARRETO et al., 2016), sendo, portanto, os produtos naturais e suas estruturas moleculares valiosos pontos de partida para a descoberta de novos medicamentos (Do VAL et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como medicamentos (OMS, 2011). Os produtos naturais têm tido papel fundamental no desenvolvimento de drogas, e novas substâncias químicas registradas para ação anticancerígena foram obtidas a partir de fontes naturais, direta ou indiretamente. Estima-se ainda que 49% das moléculas aprovadas no mesmo período tenham sido originadas dos produtos naturais e seus derivados (SILVA, 2017; NEWMAN, CRAGG, 2016). Já nos países desenvolvidos, o uso de plantas medicinais está impulsionado pela preocupação com os efeitos adversos dos fármacos sintetizados (FLÓRIO, 2019; BOLZANI, 2016).

A *Stemodia maritima* Linn (*S. Maritima*) é uma planta pertencente à família Plantaginaceae, é um terpeno que possui um esqueleto estemodano tetracíclico raro com metabólitos secundários bioativos. Podendo ser encontrada em países da América do Sul, ilhas do Caribe e na região Nordeste do Brasil, é popularmente conhecida como “*mastruz-bravo*” ou “*melosa*” (SILVA et al., 2006), encontrada próxima à costa marítima, e é usada pela população para tratar doenças de origem inflamatória (SOUZA, 2017). Além disso, as folhas e o caule possuem atividade antiviral, citotóxica, larvicida e bactericida (AZEVEDO, 2019; SILVA, 2013; RODRIGUES et al., 2010).

Estudos realizados por pesquisadores sobre as folhas da *S. maritima* evidenciaram que extrato hexânico dessas folhas exibe atividade gastroprotetora em ratos, aumentando a concentração de Óxido nítrico (NO) e glutathiona reduzida e diminuindo os índices de mieloperoxidase nos tecidos avaliados (OLIVEIRA, 2021; SILVA, 2017). Estudo do nosso grupo de pesquisa com extrato etanólico de *S. maritima* mostrou propriedades anti-inflamatórias, diminuindo os níveis de TNF- $\alpha$ , CINC-1, estresse oxidativo e a transcrição dos genes TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , RANK e iNOS (TEIXEIRA et al., 2017). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da *S. Maritima* e do isolado Sm-1 na dor inflamatória da articulação temporomandibular (ATM), no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM (AZEVEDO, 2019).

A partir de SM-1, obtiveram-se os derivados semissintéticos com potencial biológico SM-2 e SM-3 a partir de reações como oxidação, oximação e esterificação (OLIVEIRA, 2021). Em estudo também do nosso grupo, Fernandes, em 2020, demonstrou que dois derivados da estemodina, SM-2 e SM-3, apresentaram-se seguros e com efeitos antinociceptivos em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. Diante da observância a essas propriedades anti-inflamatórias, SM-2 e SM-3 tornaram-se relevantes para a condução de trabalhos que investiguem novos potenciais terapêuticos, como em oncologia.

O câncer é uma doença que se inicia através do crescimento desorganizado das células que ocupam os tecidos e órgãos, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que comandam a proliferação e diferenciação celular excessiva, formando tumores que podem avançar para outros tecidos do corpo, causando o que é denominado de metástase (ABBAS, 2015; INCA, 2021).

O carcinoma de células escamosas de boca (CCE), também denominado como carcinoma epidermoide, carcinoma escamocelular ou carcinoma espinocelular, é uma neoplasia maligna. Se origina no epitélio de revestimento, sendo considerado a neoplasia maligna oral mais comum (BRENER et al., 2007) e agressiva nesta região, tornando-se responsável por aproximadamente 60% de todos os cânceres da cavidade oral. Em geral, o tumor ocorre nas bordas laterais e na superfície ventral da língua (OMURA, 2014). O prognóstico do CCE, em geral, é muito ruim e possui uma alta capacidade metastática (GUPTA et al., 2015).

Do ponto de vista epidemiológico e clínico-patológico, o “câncer bucal” (CCEB) pode ser dividido em três categorias: carcinomas da cavidade oral propriamente dita, carcinomas do vermelhão do lábio e carcinomas originados na orofaringe. Tumores intraorais e orofaríngeos são mais comuns em homens do que em mulheres, com uma relação homem: mulher de mais de 2:1. No entanto, a disparidade na proporção homem: mulher tornou-se menos pronunciada ao longo do último meio século, provavelmente porque as mulheres têm se exposto mais tabaco e álcool, com isso, produtos relacionados ao surgimento dos carcinomas na cavidade oral (SILVA,2017; NEVILLE,2002; SWANGO,1996; RIES,1991).

No Brasil, o CCEB é diagnosticado na maioria dos casos em estágios avançados, dificultando o tratamento e reduzindo o índice de sobrevida dos pacientes. Esse fato torna fundamental o melhor entendimento do processo molecular de carcinogênese para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e para a descoberta de novas drogas

terapêuticas (SILVA, 2017). Os produtos naturais têm tido papel fundamental no desenvolvimento de drogas, visto que no período de 1940 até 2014, 83% das 136 novas substâncias químicas registradas para ação anticancerígena foram obtidas a partir de fontes naturais, direta ou indiretamente. Estima-se ainda que 49% das moléculas aprovadas no mesmo período tenham sido originadas dos produtos naturais e seus derivados (NEWMAN, CRAGG, 2016).

Diversos trabalhos experimentais e epidemiológicos demonstraram que o consumo de algumas plantas pode promover ação quimiopreventiva e/ou antineoplásicas (OLIVEIRA L.A.R et al.;2014; FUKUMASU et al., 2008; OMS, 2002; SIMÕES et al., 2002). Nos países em desenvolvimento o amplo uso de terapias alternativas ou complementares, como o uso de plantas medicinais, se atribui à maior disponibilidade e acesso. Já nos países desenvolvidos, o uso está impulsionado pela preocupação com os efeitos adversos dos fármacos sintetizados (OMS, 2011).

No contexto dos medicamentos utilizados para tratamento do câncer, o paclitaxel (Taxol®) destaca-se como o grande caso de sucesso da semissíntese. Este composto é um potente agente anticâncer que foi descoberto em 1971, por Monroe E. Wall e Mansukh C. Wani, sendo extraído das cascas da espécie *Taxus brevifolia* (OLIVEIRA, 2021; XIÃO; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016).

Diante disso, os extratos obtidos das matrizes vegetais têm ação anticancerígena em diversas linhagens tumorais. De acordo com dados nas literaturas, compostos vegetais como polifenóis, alcaloides e terpenos são amplamente utilizados por terem ação antiproliferativa e desempenharem efeitos quimiopreventivos e terapêuticos (ŽITEK et al.,2020).

Dessa forma, produtos à base de vegetais, mesmos que biotransformados quimicamente, podem ser promissores no tratamento de CCE e na diminuição de reações adversas ao organismo do paciente durante o seu tratamento (ŽITEK et al., 2020).

O presente trabalho ocorreu em duas etapas experimentais. A primeira etapa ocorreu no Brasil na Universidade Federal do Ceará, no Campus Sobral, onde se avaliou toxicidade aguda *in vivo* e Docking molecular *in silico* A segunda etapa ocorreu na Faculdade de Odontologia da Universidade de Toronto no Canadá para avaliar o efeito antitumoral do SM-2 em um modelo experimental *in vivo* no câncer de língua induzido por agente químico 4-NQO em camundongos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas Medicinais na Saúde

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 60-80% da população mundial utiliza ou já utilizou algum medicamento à base de planta (FLÓRIO, 2019; OMS, 2011). A resolução nº 62.13 da Assembleia Mundial da Saúde, aprovada em maio de 2009, pelos Estados Membros da OMS, desenvolveu políticas e regulamentos internacionais para promover o uso apropriado e seguro de produtos obtidos a partir de plantas que possuem propriedades farmacológicas eficazes no tratamento de doenças, incentivando a realização de pesquisas científicas que comprove sua eficácia. No Brasil, o sucesso dos fitoterápicos é notório, haja vista que estudos mostram que mais de 90% da população faz usos de fitoterápicos no tratamento de doenças (FLÓRIO, 2019).

Ainda há dúvidas sobre a importância dos estudos “etnos” dirigidos versus estudos aleatórios na seleção de plantas para a descoberta de novos fármacos. Contudo, para certas doenças, os relatos etnofarmacológicos e etnobotânicos de populações tradicionais têm se mostrado um valioso atalho (KHAFAGI e KEWEDER, 2000; ELISABETSKY, 2003; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Embora grande parte do potencial da Biodiversidade ainda permaneça inexplorada, diferentes estudos farmacológicos com produtos obtidos de plantas da flora brasileira revelam o potencial terapêutico de várias espécies em modelos que amenizam o dano inflamatório e a dor por diferentes estímulos (SARAIVA et al., 2015). O uso de plantas para o tratamento de diversas enfermidades no Nordeste é bastante difundido, especialmente nas cidades do interior, onde o sistema de saúde é precário e muitas vezes praticamente inexistente. Muitas espécies, mesmo descritas na medicina tradicional, entretanto, não devem ser utilizadas pela população sem que haja conhecimentos científicos sobre sua taxonomia (identificação botânica), composição química, farmacologia, toxicologia, prova de conceito e dados de pesquisa clínica que confirmem eficácia terapêutica.

Portanto, é fundamental a pesquisa científica de identificação dos produtos naturais, incluindo aqueles responsáveis pelas propriedades terapêuticas das espécies brasileiras usadas na medicina popular, muitas vezes distinto dos relatos de uso tradicional dos nossos indígenas (BOLZANI, 2016).

### **2.1.1 Família Plantaginaceae e importância econômica**

Plantaginaceae é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor), pertencente à divisão: Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida e à ordem Lamiales. Plantaginaceae tem uma distribuição cosmopolita e inclui cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies. Destes, 45 gêneros e 370-400 espécies são nativos dos Neotrópicos. Família na qual encontrasse o gênero *Stemodia* L.:(56 espécies, 32 Neotropical) Pantropical (IPN,2021). As espécies de Plantaginaceae são morfológicamente caracterizadas pelas suas folhas alternas, simples ou compostas (IPN,2021; ALBACH; MEUDT; OXELMAN, 2005). A importância econômica fica por conta de substâncias produzidas nos metabólitos primários e secundários produzidos por algumas espécies que auxiliam no tratamento de doenças, como a leishmaniose e doenças cardíacas (RIBEIRO et al., 2014; RUSSELL et al.,2011).

### **2.2 Metabólitos secundários e o gênero *Stemodia***

Metabólitos secundários que são o grupo de substâncias que se destacam na literatura por apresentarem atividades biológicas interessantes (SIMÕES et al., 2017), como triterpenos, diterpenos e flavonoides foram isolados de espécies do gênero *Stemodia*, porém, os diterpenos contendo um esqueleto tetracíclico incomum, conhecido como estemodano, são os compostos que caracterizam quimicamente as plantas desse gênero (SILVA W.M.B, 2009). O gênero *Stemodia* é um arbusto da família Scrophulariaceae, também conhecida como “matruz-bravo ou “meladinha” é conhecida na medicina popular, para tratamento de infecções do trato respiratório e ginecológicos. Recentemente, pesquisas taxonômicas com base em dados genéticos e moleculares, com o advento de ferramentas moleculares originando novas identificações, permitiu o posicionamento de muitas espécies que estão sendo reclassificadas e/ou transferidas para a família Plantaginaceae (OLIVEIRA,2021; SOUZA,2017; BOLZANI,2016). O gênero *Stemodia* é constituído por cerca de 60 espécies, todas de pequeno porte, sendo ervas anuais e/ou arbustos perenes, de ocorrência nas regiões tropicais dos continentes Asiático, Africano, Australiano e Americano (SCATIGNA 2020; SOUZA, 2015; SILVA, 2009; CHAMY et al.,1991) em áreas litorâneas. No Brasil o gênero *Stemodia* é um arbusto comum, que cresce amplamente na região nordeste, próximo ao litoral no estado do

Ceará, pertencente à família Plantaginaceae, tribo *Gratioleae Benth* (ALBACH et al.,2005).

### 2.2.1 *Stemodia maritima* e os derivados semissintéticos diterpênicos

O derivado isolado a partir das folhas da *Stemodia maritima* (*S. Maritima*) (**Fig. 1**) é o diterpeno estemodano mais relatado de *S. maritima* por possuir um esqueleto tetracíclico raro e metabólitos secundários ativos que ficaram conhecidos como estemodano uma característica química das plantas do gênero *Stemodia*. Devido à semelhança e os relatos de apresentarem propriedades antiviral e citotóxica, esses metabólitos secundários diterpênicos têm sido alvos de inúmeras biotransformações, resultando em diterpenoides rearranjados quimicamente para estudo dos seus bioativos encontrados (SILVA,2017; CHAMY et al., 1991). Essas características químicas e estruturais levou a *S. maritima* a ser utilizada por populares no litoral do nordeste do Brasil no Ceará para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, gastralgia, edema e inflamações.

**Fig. 1-** *Stemodia maritima*

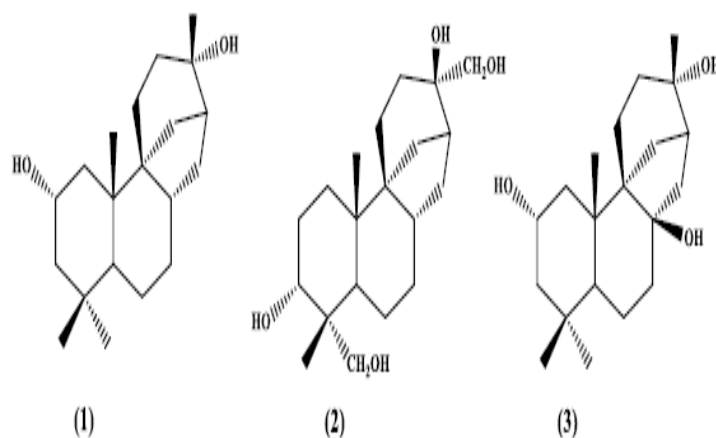


**Fonte:** Leonelli et al., 2021.

A Estemodina (Sm-1) é um importante derivado estemodano (figura 2), oriundo do isolamento químico de extratos das folhas da *S. maritima*. Possui diterpenos bioativos, que caracterizam quimicamente as plantas do gênero *Stemodia*, o que o torna uma alternativa interessante e alvo de estudos das estruturas dos esqueletos estemodano. Sua semelhança estrutural com afidicolina (2), um relevante agente citotóxico e antiviral isolado de culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola* e o 8 $\beta$ -hidroxistemodina (3), e por possuírem metabólitos secundários que têm sido alvos de inúmeras biotransformações, têm

resultado em diterpenoides rearranjados biologicamente ativos (**Fig. 2**) (AZEVEDO, 2019; HANSON, 2018; OLIVEIRA, 2021, RUSSEL et al.,2011).

**Fig. 2-** Fórmula estrutural da Estemodina (1), Afidicolina (2) e 8 $\beta$ -hidroxistemodina (3).



**Fonte:** Oliveira, 2021.

Tanto *S. Maritima* quanto o diterpeno Sm-1 apresentaram moderada ação bactericida (SILVA, 2013). Os derivados semissintéticos estemodanos com potencial biológico SM-2 e SM-3 surgiram a partir de Sm-1, a partir de reações como oxidação, oximação e esterificação (OLIVEIRA, 2021). O nosso grupo também demonstrou o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da *S. Maritima* e do derivado Sm-1 na dor inflamatória da articulação temporo-mandibular (ATM), no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM (AZEVEDO, 2019).

O estudo de Fernandes, em 2020, demonstrou que dois derivados diterpênicos da estemodina, SM-2 e SM-3, apresentaram-se seguros e com efeitos antinociceptivos em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. Diante da observância a essas propriedades anti-inflamatórias, SM-2 e SM-3 tornaram-se relevantes para a condução de trabalhos que investiguem novos potenciais terapêuticos, bem como os mecanismos de ação envolvidos (SILVA,2017; CHAMY et al., 1991).

### 3 JUSTIFICATIVA

Em muitas sociedades, o emprego terapêutico de recursos naturais para a manutenção da saúde continua sendo uma prática comum. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 60-80% da população mundial utiliza ou já utilizou algum medicamento à base de planta (FLÓRIO, 2019; OMS, 2011). A resolução nº 62.13 da Assembleia Mundial da Saúde, aprovada em maio de 2009 pelos Estados Membros da OMS, desenvolveu políticas e regulamentos internacionais para promover o uso apropriado e seguro de produtos obtidos a partir de plantas que possuem propriedades farmacológicas eficazes no tratamento de doenças, incentivando a realização de pesquisas científicas que comprove sua eficácia. No Brasil, o sucesso dos fitoterápicos é notório, haja vista que estudos mostram que mais de 90% da população faz usos de fitoterápicos no tratamento de doenças (FLÓRIO, 2019).

Segundo Newman e Cragg (2020), de um total de 1394 medicamentos aprovados a partir de pequenas moléculas entre os anos de 1981 a 2019, 441 (33,6%) são oriundos diretamente de produtos naturais. Além disso, 282 (20,4%) são originados indiretamente de produtos naturais (NEWMANN e CRAGG, 2020). Sob uma perspectiva farmacológica, muitos compostos que já foram extraídos de fontes naturais, tiveram suas propriedades biológicas asseguradas e são amplamente utilizados como medicamentos (OLIVEIRA, 2021).

O câncer é uma das principais causas de morte nas Américas. Em 2008, causou 1,2 milhão de mortes, 45% das quais ocorreram na América Latina e no Caribe. Prevê-se que a mortalidade por câncer nas Américas aumente para 2,1 milhões até 2030 (WHO,2017; ATTY et al.,2020). O impacto do aumento da incidência de tumores no Sistema Único de Saúde (SUS) pode ser contabilizado pelo rápido aumento de internações, tratamentos químicos e radioterápicos e seus custos no tratamento de diferentes tumores malignos. O CCEB é um problema de saúde pública no Brasil, com estimativas de incidência que o mostram como o 5º câncer mais comum entre os homens e o 12º entre as mulheres (INCA, 2020; SILVA, 2017).

Ademais, dentre os 128 medicamentos anticâncer lançados no mesmo período, 12 eram produtos naturais inalterados, 32 derivados de produtos naturais, 20 totalmente sintéticos e 35 semissintéticos ou que mimetizam o produto natural (NEWMAN e CRAGG, 2012). Os produtos naturais têm tido, portanto, papel fundamental no desenvolvimento de drogas, visto que no período de 1940 até 2014, 83% das 136 novas



substâncias químicas registradas para ação anticancerígena foram obtidas a partir de fontes naturais, direta ou indiretamente. Estima-se ainda que 49% das moléculas aprovadas no mesmo período tenham sido originadas dos produtos naturais e seus derivados (NEWMAN, CRAGG, 2016).

De acordo com dados epidemiológicos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil em 2019, levantou uma estimativa de que 11.180 casos novos da doença fossem registrados em homens e 4.010 em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022. As regiões Sudeste e Sul do Brasil apresentam as maiores taxas de incidência e de mortalidade da doença (ATTY et al., 2020). Embora a incidência do carcinoma de células escamosas (CEC) no Brasil seja menor que outros tipos de câncer, continua sendo devastador e interferindo na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (INCA, 2020).

Em 2002, no bilionário mercado mundial farmacêutico, um terço do lucro foi representado por apenas dois grupos de quimioterápicos derivados de produtos naturais, os taxanos e os derivados da camptotecina (OBERLIES e KROLL, 2004; CHIN et al., 2006). Portanto, o uso de estudos etnobotânicos para a caracterização e desenvolvimento de novos agentes quimiopreventivos e terapêuticos é um excelente meio no desenvolvimento de novas drogas (SILVA, 2017).

Diante do fato de que estudos prévios corroboram que o derivado semissintético SM-2 atestou ser promissor como numa nova abordagem terapêutica no controle da resposta inflamatória, levantou-se então a possibilidade desse composto exercer também efeitos antitumorais no câncer de língua.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Estudar a toxicidade do derivado semissintético, alvos moleculares através de *Docking* molecular e o efeito de SM-2 em modelo pré-clínico no câncer de língua em camundongos.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Realização do teste de toxicidade aguda do composto do SM-2, utilizando protocolo experimental OECD 425;
2. Estudo do *Docking* molecular do composto SM-2 nos alvos moleculares das estruturas proteicas de: TNF3 $\alpha$  (PDB: 1TNF), 1L-1 $\beta$  (PDB: 1ITB), HO-1 (PDB: 1N3O), iNOS (PDB: 3NQS), Receptor TRPV1 (PDB: 5IS0), Receptor P2X7 (PDB: 5U1W) e

receptores opioides: Mu ( $\mu$ ) (PDB: 4DK1), Kappa ( $\kappa$ ) (PDB: 4DJH) e Delta ( $\delta$ ) (PDB: 6PT3);

3. Avaliação do tratamento oral e tópico local com SM-2, na carcinogênese induzida por agente químico 4-NQO, no câncer de língua em modelo animal.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 O Tipo de estudo, comitê de ética (CEUA) e os recursos financeiros

O estudo utilizou 19 camundongos *Swiss* (machos e fêmeas), pesando em média 25g, e os grupos randomizados. Todos os esforços foram realizados para minimizar quaisquer tipos de sofrimento aos animais. O projeto de pesquisa e as metodologias utilizadas foram aprovadas no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, protocolo nº11//2018(anexo I), o aspecto ético do protocolo experimental foi elaborado de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA. Seguindo o acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação em Animais (CONCEA – Brasil) e do guia ARRIVE (KILKENNY et al., 2010). O recurso financeiro na primeira etapa do projeto no Brasil foi realizado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP, processo nº BP5-0197-00180.01.00/22.

### 5.2 Ensaio de toxicidade Oral Aguda: Procedimento *Up and Down* nº425 (OECD)

O teste de toxicidade oral aguda é uma etapa fundamental dentro da pesquisa por um novo composto com potencial farmacológico pois permite avaliar a toxicidade de um composto quando administrado em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 h, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. É utilizado como um rastreio inicial de toxicidade, permitindo estimar a dose letal (DL50) e classificar a amostra de acordo com os critérios do *Globally Harmonised System* (GHS) (ANVISA, 2013; 2016). Um dos testes realizados *in vivo* é a Toxicidade Oral Aguda em que se investiga a toxicidade produzida por uma substância teste na concentração máxima de 2000 mg/kg e, quando justificável, na concentração máxima de 5000 mg/kg seguindo o protocolo *Up and down* nº425 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2008).

### **5.2.1 Animais**

Os animais camundongos *Swiss* (machos e fêmeas) n=19, pesando em média 25g. provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral, UFC-Campus Sobral e ficaram alojados em gaiolas de plástico de polipropileno padronizadas em sala com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) obedecendo aos ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no Biotério Setorial da UFC - Campus Sobral durante o experimento, recebendo água e alimentação *ad libitum* à vontade. O número de animais usados foi de n=6 ou n=5 por grupo, todos os grupos foram randomizados e cada animal foi usado apenas uma vez. Foi utilizado, portanto, o número de animais mínimo necessário para atingir um valor estatístico baseando-se em estudos científicos publicados anteriormente (OECD,2008). Todos os esforços foram realizados para minimizar quaisquer tipos de sofrimento aos animais. Os pesos dos animais foram registrados nos dias 1º, 7º e 14º do teste. No 15º dia, o animal era pesado e verificado seu estado de saúde no final do período do protocolo experimental. Os animais foram divididos em grupo salina (controle), grupo que recebeu SM-2 (DOSE), divididos em machos e fêmeas.

#### **5.2.1.1 Avaliação comportamental**

Todos os grupos foram observados, e os parâmetros comportamentais analisados por 14 dias consecutivos do início do protocolo experimental. Os parâmetros foram avaliados foram: agitação, agressividade, cambalhota, contorção, lambida, perda de peso, piloereção, pulsão sexual e sonolência. Avaliação comportamental aconteceu durante os primeiros 40 minutos seguintes à administração da dose única SM-2 (2000 µg/kg) para cada animal testado, e, posteriormente, a avaliação aconteceu diariamente por 10 minutos individualmente por 14 dias consecutivos.

#### **5.2.1.2 Coleta de amostras biológicas**

No 15º dia, cada animal recebia uma dose de overdose de Ketamina 300mg/kg + Xilazina 30mg/kg (via peritoneal). Após avaliação técnica do estado de saúde do animal, eram coletadas amostras de sangue variando entre 900 µL e 1 mL (via plexo orbital), centrifugadas no tubo coleta de sangue vácuo amarelo ativador de coágulo + gel 5mL e

armazenadas no freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para análise dos níveis séricos de ácido úrico, creatinina, enzima alanina aminotransferase (ALT) e enzima aspartato aminotransferase (AST). Os órgãos: baço, coração, fígado e rim foram retirados após a eutanásia e armazenados em Formaldeído a 4% tamponado para avaliação técnica do patologista.

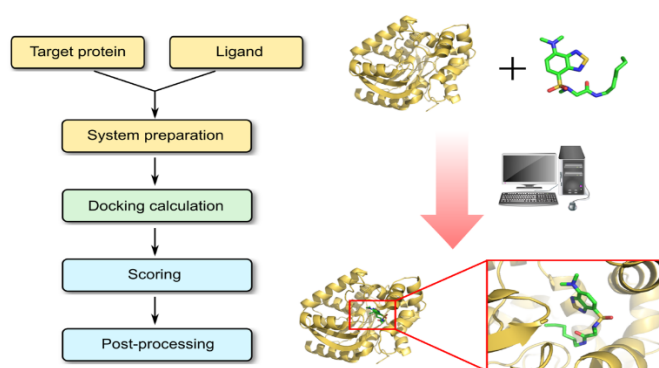
### 5.2.2.2 Processamento das amostras histopatológicas

Para fixação: após retirada os órgãos, deve-se imergir em um volume de 10x a 20x o tamanho das amostras em formol tamponado por 24h. Após 24h, realiza cortes longitudinais dos órgãos (cortes frontais) – secciona com navalha ou lâmina de bisturi - e submergido por 48h no formol tamponado 10%. Após a etapa do Formol Tamponado, lavou-se as amostras em água de torneira e trocou-se a solução para álcool 70%. O protocolo de preparação das amostras aconteceu mediante as seguintes etapas no Laboratório de Histopatologia do NEMPI: Processamento (Desidratação e Diafanização); Inclusão, Microtomia e Coloração. Para realização da análise histopatológica das lâminas e os parâmetros avaliados: edema e congestão vascular e escores atribuídos de acordo com os níveis: **0-** ausente; **1-** infiltração muito leve; **2-** moderado; **3 -** infiltração intensa.

### 5.3. DOCKING MOLECULAR

O *docking* molecular é uma técnica computacional que foi utilizada como uma aliada no processo de avaliação pela bioinformática das possíveis ligações e afinidades proteicas do SM-2. Tem como objetivo demonstrar as suas possíveis conformações e estima a sua afinidade de ligação. Com o aumento de estruturas de mais receptores-alvos determinados, esta técnica é extensivamente usada na descoberta de novas moléculas com potencial biológico (**fig.3**).

**Fig.3** - Processamento do *Docking* molecular com proteínas-ligantes



**Fonte:** <https://www.profacgen.com/protein-ligand-docking.htm>. **Legenda:** A imagem exemplifica o processamento do acoplamento no *docking* molecular e suas etapas até a

proteína ligante e sua conformação em tridimensional para banco de dados baseados nas estruturas.

O *docking* molecular buscou os potenciais alvos biológicos do SM-2, sendo realizado o uso de bibliotecas e repositórios de estruturas de medicamentos em uma ferramenta da bioinformática (GODOY, 2021).

### 5.3.1 Propriedades do ADMET

A predição do comportamento farmacocinético dos compostos foi avaliada pelas propriedades do ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Os valores quantitativos e qualitativos foram obtidos no servidor online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), do *Swiss Bioinformatic Institute* (SBI) e os parâmetros toxicológicos serão gerados usando os preditores de toxicidade PROTOX-II (YANG et al. 2019) e eMolTox (JI et al., 2018).

#### 5.3.1.1 O software do *Docking* Molecular do SM-2

A realização do *Docking* Molecular do derivado semissintético SM-2 foi realizada através do uso das modeladas tridimensionais no software Avogadro 1.1.2 (HANWELL et al., 2012) e otimizada geometricamente utilizando o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G (d) presentes no software GAMESS (BARCA et al., 2020).

#### 5.3.2.1 Alvos terapêuticos analisados

As Estruturas proteicas (alvos) de TNF $\alpha$  (PDB: 1TNF), 1L-1 $\beta$  (PDB: 1ITB), HO-1 (PDB: 1N3O), iNOS (PDB: 3NQS), Receptor TRPV1 (PDB: 5IS0), Receptor P2X7 (PDB: 5U1W) e receptores opioides: Mu ( $\mu$ ) (PDB: 4DK1), Kappa ( $\kappa$ ) (PDB: 4DJH) e Delta ( $\delta$ ) (PDB: 6PT3) de organismo *homo sapiens* irão ser obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), todas as estruturas foram definidas pela técnica de difração de raios-X e com resolução entre 1.20 – 3.10 Å.

#### 5.3.2.2 Posicionamento dos encaixes do acoplamento

As posições dos encaixes do acoplamento foram baseadas no ligante nativo das macromoléculas disponíveis no PDB e com o uso do *Web Server Computed Atlas of Surface Topography of proteins* - CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>). Para simulações de *Docking* molecular foram utilizados o AutoDock tools (ADT) para

preparação dos ligantes e alvos (MORRIS et al., 2009) e AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (TROTT; OLSON, 2010). A afinidade de ligação e as interações entre resíduos usada para determinar melhores interações moleculares. Os resultados visualizados usando ADT, *Discovery Studio* v4.5 (Biovia, 2020) e UCSF *Chimera X* (PETTERSEN et al., 2021).

## 6 RESULTADOS DOS TESTES: TOXICIDADE AGUDA E DOCKING MOLECULAR

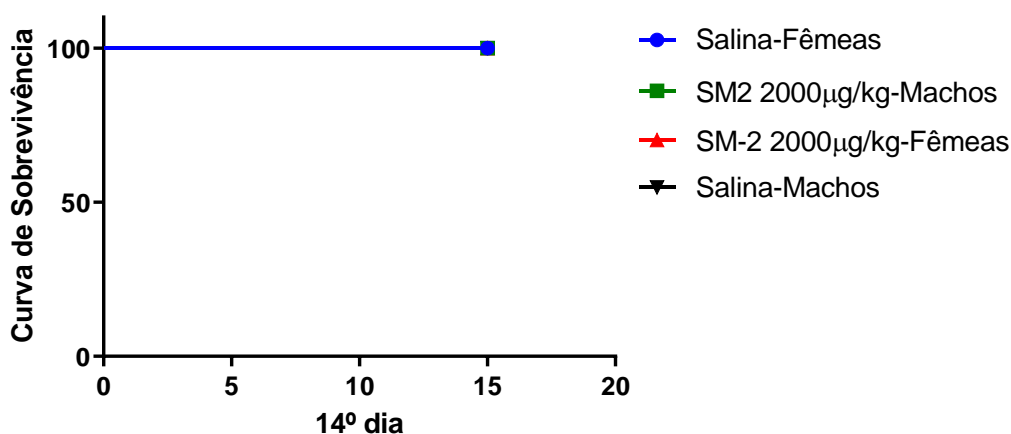
### 6.1 Resultado do Teste de Toxicidade Aguda do SM-2

#### 6.1.1 Taxa de sobrevivida

Não foram observadas mortalidade nos animais tanto no grupo Salina quanto no grupo SM-2 durante os 14 dias do teste, apresentando taxa de sobrevivida de 100% (**Figura 2; Tabela 1. Fig.4**).

**Tabela 1:** Taxa de sobrevivida dos animais no ensaio de segurança de SM-2.

**Fig. 4** – Curva de Sobrevivência



**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:** Não há queda na curva representando o decréscimo de percentual de sobrevivida.

### 6.2 Alterações comportamentais

Através da análise dos resultados do teste comportamental é possível confirmar que a maioria dos comportamentos foram similares entre o grupo salina e o grupo SM-2 (**tabela 2**). Houve a presença dos parâmetros comportamentais de agitação,

agressividade, piloereção e sonolência no grupo SM-2, quando comparado ao grupo controle salina.

**Tabela 2:** Alterações comportamentais relativas dos animais no ensaio de segurança e toxicidade aguda de SM-2 na dose única de 2000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

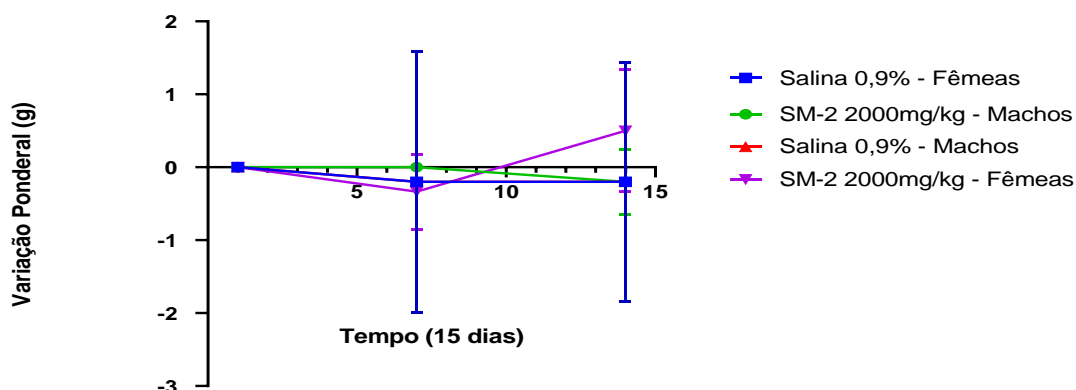
Parâmetros Comportamentais	Salina ♂	SM-2 ♂ 2000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Salina ♀	SM-2 ♀ 2000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Agitação	S	N	N	N
Agressividade	S	S	S	S
Cambalhota	S	N	N	N
Contorção	N	N	S	S
Lambida	S	S	S	S
Perda de Peso	N	N	S	N
Piloereção	S	S	S	S
Pulsão Sexual	N	N	N	N
Sonolência	N	N	S	N

**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:** S=Sim e o N= Não. A avaliação das alterações comportamentais, foram observadas imediatamente após a administração do composto semissintético SM-2, diariamente até o 14º dia do teste.

### 6.2.1 Alterações do peso corporal

Não ocorreu variação significativa no peso dos animais que receberam SM-2 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (**fig. 5**) quando comparados ao grupo controle Salina durante os 14 dias de avaliação foram registrados, e no 15º dia do teste ocorreu a eutanásia

**Fig. 5-** Variação do Peso Ponderal



**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:** A Variação ponderal em camundongos tratados com SM-2 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , durante 15 dias consecutivos da dose administrada.

### 6.2.1.1 Alterações do peso relativo dos órgãos

Na análise macroscópica dos órgãos não foi constatado que não houve alterações significativas em relação ao grupo controle. Foi analisado o peso relativo dos órgãos (baço, coração, estômago, fígado e rim dos animais) (órgão/peso corporal x 100). Não ocorreu variação no peso dos órgãos dos animais que receberam SM-2 2000 µg/kg machos e fêmeas ( $0,4549 \pm 0,4333$ ), quando comparados ao grupo controle Salina machos e fêmeas ( $0,3835 \pm 0,4333$ ), resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), constatando que não houve alteração em relação ao grupo controle durante os 14 dias de avaliação (**tabela 3**).

**Tabela 3:** Os Efeitos da de SM-2 2000 µg/kg sobre os pesos relativos dos órgãos dos camundongos machos e fêmeas (*Swiss*) por 14 dias.

Órgão (g)	Salina ♂	SM-2 ♂	Salina ♀	SM-2 ♀
Baço	0,38 $\pm$ 0,10(5)	0,45 $\pm$ 0,05(5)	0,43 $\pm$ 0,10(5)	0,47 $\pm$ 0,06(6)
Coração	0,46 $\pm$ 0,09(5)	0,59 $\pm$ 0,34(5)	0,52 $\pm$ 0,02(5)	0,59 $\pm$ 0,12(6)
Estômago	0,93 $\pm$ 0,12(5)	1,56 $\pm$ 1,19(5)	1,06 $\pm$ 0,13(5)	1,32 $\pm$ 0,14(6)
Fígado	4,25 $\pm$ 0,81(5)	3,96 $\pm$ 0,49(5)	4,83 $\pm$ 0,81(5)	5,09 $\pm$ 0,71(6)
Rim	0,71 $\pm$ 0,12(5)	0,67 $\pm$ 0,03(5)	0,80 $\pm$ 0,07(5)	1,02 $\pm$ 0,20(6)

**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:** Peso relativo dos órgãos: baço, coração, estômago, fígado e rins de camundongos Swiss. Grupo controle recebeu apenas veículo (solução salina). Dados são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Salina (ANOVA, Tukey).

### 6.2.1.2 Avaliação da Hepatotoxicidade das amostras séricas

O tratamento por 14 dias consecutivos com o SM-2 2000 µg/kg não provocou diferenças significativas nos níveis séricos de ácido úrico, creatina e as enzimas alaninaaminotransferase (ALT), aspartoaminotransferase (AST) no soro de camundongos machos e fêmeas, quando comparados com o grupo salina (**Tabela 4**).



**Tabela 4:** Níveis Séricos de ácido úrico, creatinina, ALT e AST de camundongos machos e fêmeas (*Swiss*) tratados com SM-2 por 14 dias.

Grupos	Ácido úrico	Creatinina	Enzima ALT (U/mL)	Enzima AST (U/mL)
Salina ♂	80,80±5,15(5)	27,20±12,83(5)	1,03±0,07(5)	0,16±0,016(5)
SM-2 ♂ 2000µg/kg	48,6±5,92(5)	25,00±23,08(5)	4,95±6,43(5)	9,30±5,60(5)
Salina ♀	80,80±5,15(5)	27,20±12,83(5)	1,03±0,07(5)	0,16±0,016(5)
SM-2 ♀ 2000µg/kg	92,17±34,96(6)	1,50±0,83(6)	2,20±3,70(6)	1,26±6,57(6)

**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:**  $p > 0,05$  em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA, Tukey).

### 6.3 Análise histopatológica

Não foram observadas alterações no baço, coração, estômago e rim dos animais tratados com SM-2 2000 µg/kg quando comparados ao grupo salina. Foram observadas alterações significativas no parâmetro edema e congestão vascular, no fígado, entretanto são alterações consideradas reversíveis (**Tabela 5**). Foram observados os parâmetros e classificados em níveis: **0**- ausente; **1**-infiltração muito leve; **2**- moderado; **3** -infiltração intensa.

**Tabela 5:** Efeito do tratamento com SM-2 na análise histopatológica (H & E) nos órgãos: baço, coração, estômago, rim e fígados dos animais.

Órgãos/ Parâmetros Histopatológicos	Grupos			
	Salina ♂	SM-2 ♂	Salina ♀	SM-2 ♀
<b>Baço</b>				
Hiperplasia Polpa branca	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
Congestão Polpa vermelha	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Hemorragia Pigmentos	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
Hemossiderina	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)

<b>Coração</b>				
Hipertrofia	0(0-1)	0(01)	0(0-1)	0(0-1)
Congestão/Hemorragia	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
Áreas de necrose	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
<b>Estômago</b>				
Perda de células	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
Edema	0(0-0)	1(1-2)	0(0-0)	0(0-1)
Lesão Hemorrágica	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)
Infiltrado inflamatório	0(0-0)	1(1-2)	0(0-0)	0(0-1)
<b>Fígado</b>				
Perda de células	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1)
Edema	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	1(1-2)
Hemorragia sinusoides	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
Congestão vascular	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)	1(1-2)
Infiltrado inflamatório	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
<b>Rim</b>				
Perda de células	0(0-0)	1(0-1)	0(0-0)	1(0-1)
Edema	0(0-0)	1(0-2)	0(0-0)	1(0-2)
Hemorragia	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)
Infiltrado inflamatório	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)
Necrose	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)

**Fonte:** Autor (a). Dados da Pesquisa (2021). **Legenda:** **0-** ausente; **1-** infiltração muito leve; **2-** moderado; **3 -** infiltração intensa. Os dados obtidos não tiveram significância estatística no T test; pós teste- Mann Whitney, com relação ao grupo salina.

### 6.3 Resultado do *Docking* molecular

O *Docking* molecular é o estudo por meio da bioinformática de possíveis moléculas bioativas, que são testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual ou quais delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo. Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação

necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado.

Dessa forma, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica (BARROS, 2015), como no caso do estudo do derivado semissintético SM-2, demonstrados nas tabelas 6, 7 e 8 abaixo.

**Tabela 6:** Propriedades físico-químicas da estrutura SM-2 (Regra dos 5 de Lipinski).

Moléculas	Propriedades físico-químicas				
	Peso molecular $\leq 500$ (g/mol)	Coefficiente de partição $\leq 5$ (Log $P_{o/w}$ )	Nº de aceptores de ligação de hidrogênio $\leq 10$	Nº de doadores de ligação de hidrogênio $\leq 5$	Nº de ligações rotacionáveis $\leq 10$
SM-2	362,55	4,52	3	3	3

**Fonte:** Autor (a). Dados da pesquisa, 2021.

Nesta análise foi possível observar que a molécula SM-2 passou em todos os parâmetros da regra de Lipinski. A regra de Lipinski, também conhecida como "regra dos cinco", é um conjunto de critérios utilizados na química medicinal para avaliar a adequação de uma molécula como um possível fármaco (LIPINSKI, 1997).

Esses critérios são baseados em propriedades físico-químicas que influenciam a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de uma molécula. Os critérios da regra de Lipinski são os seguintes: Peso molecular não superior a 500 g/mol; LogP (coeficiente de partição octanol-água) não superior a 5; Não mais do que 5 grupos doadores de hidrogênio de ligação de hidrogênio; Não mais do que 10 grupos aceptores de hidrogênio de ligação de hidrogênio e ligações rotacionáveis abaixo de 10.

Acredita-se que moléculas que atendem a esses critérios têm maior probabilidade de serem absorvidas pelo corpo, atravessar as membranas celulares e alcançar o local de ação, além de serem mais facilmente metabolizadas e eliminadas pelo organismo (ROGÉRIO et al., 2022), como observado na **tabela 7**.

**Tabela 7:** Parâmetros farmacocinéticos *in silico* de permeabilidade a barreiras biológicas (TGI, BHE), inibição enzimática (pGP) e metabolismo da lactona e seu derivado semissintético SM-2.

Molécula	Parâmetros Farmacocinéticos <i>in silico</i>					
	TGI	BHE	p-GP	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2
SM-2	Alto	Sim	Não	Não	Não	Não

**Fonte:** Autor (a). Dados da pesquisa, 2021. **Legenda:** **TGI:** absorção através do Trato Gastro Intestinal; **BHE:** permeabilidade através da Barreira Hematoencefálica; **pGP:** substrato para a Glicoproteína P; CYP: enzimas do citocromo P450.

Na avaliação de TGI da estrutura foi visto que é altamente absorvida por esse sistema, sendo uma possibilidade de utilização de fármaco por via oral, futuramente. A BHE é uma barreira fisiológica que impede a entrada de muitos fármacos no sistema nervoso central. Na análise da estrutura desta pesquisa foi observado que as duas conseguem atravessar esta barreira. A p-GP é uma proteína de transporte que pode impedir a entrada de alguns fármacos nas células. Alguns fármacos são substratos da p-GP, o que pode influenciar sua distribuição e eliminação no organismo. No caso do SM-2, foi observado que ambas não são substratos da p-GP e podem ser absorvidas pela célula e outras barreiras biológicas.

As enzimas CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2 proteínas hepáticas que metabolizam muitos fármacos. Se uma molécula induzir a atividade dessas enzimas, pode aumentar a taxa de metabolismo de outras moléculas, o que pode levar a uma redução da sua eficácia terapêutica ou diminuição da sua concentração plasmática. Neste teste farmacocinético foi observado uma negatividade da estrutura (**tabela 8**) do SM-2 para todas essas enzimas testadas.

**Tabela 8:** Resultados de predição de Toxicidade da estrutura do SM-2.

<b>Modelo de predição de Toxicidade</b>	<b>SM-2</b>
<b>DL50</b>	5000mg/kg
<b>Classe de Toxicidade</b>	5

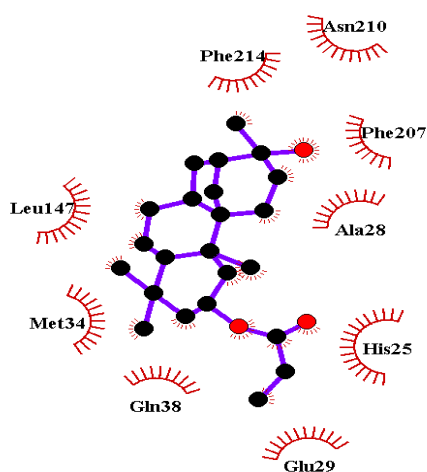
<b>Hepatotoxicidade</b>	-
<b>Precisão de predição</b>	92,9%

**Fonte:** Autor (a). Dados da pesquisa, 2021. **Legenda:** DL50 - Dose Letal média. Nos testes de toxicidade (tabela 7) das estruturas é exibido a DL50 prevista de 5000 mg/Kg para a molécula SM-2.

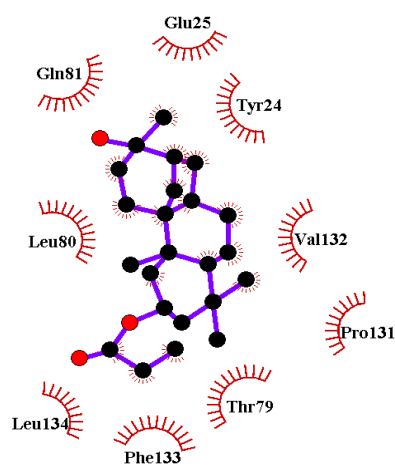
A classe de toxicidade prevista pelo software PROTOX-2 foi de categoria 5 (toxicidade baixa) para todas as estruturas (BANERJEE et al., 2018). Das avaliações de toxicidade biológica, foi possível observar no parâmetro de hepatotoxicidade que não houve uma relação positiva para ambas moléculas testadas. O Docking molecular do composto semissintético SM-2, demonstrou que o SM-2 possui afinidade de ligação com todos os alvos testados (**fig.6:** (A) Heme-Oxigenase-1(HO) ;(B) Interleucina 1(IL-1Beta);(C) Interleucina 6 (IL-6) ;(D) Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ;(E) Opiode Delta;(F) Opiode Kappa; (G) Opiode  $\mu$ ; (H) Receptor purinérgico (P2X7) ;(I) Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e (J) Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1(TRVP1).

**Fig.6-Estruturas tridimensionais do Docking molecular-SM2**

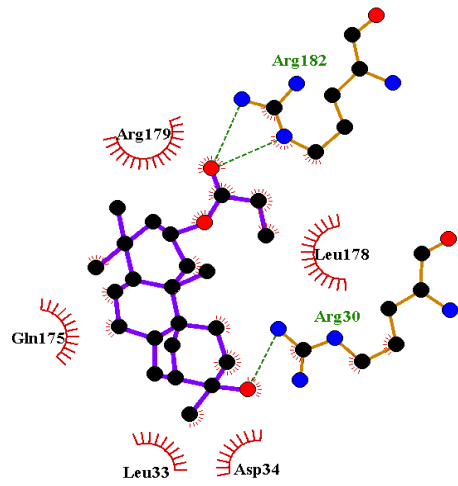
A- Heme-Oxigenase-1(HO)



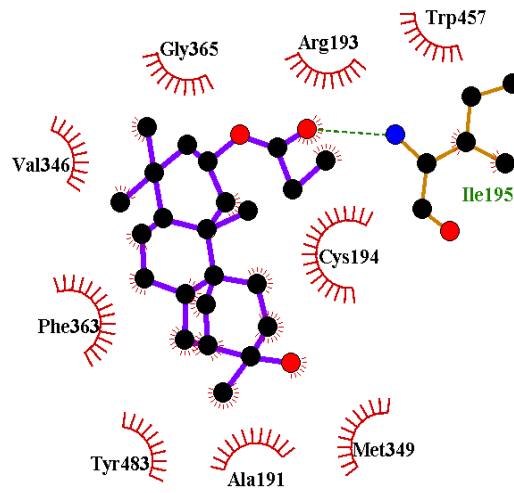
B-Interleucina 1(IL-1Beta)



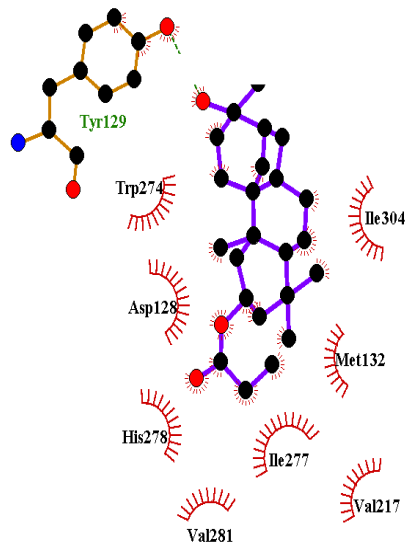
C- Interleucina 6 (IL-6)



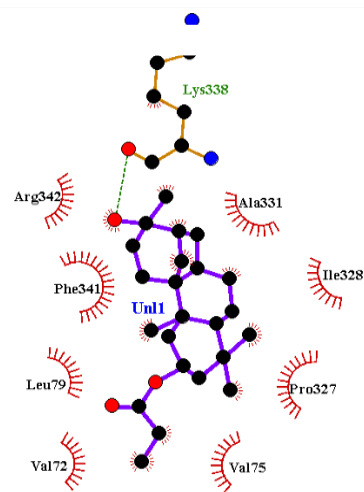
D-Óxido nítrico sintase induzível(iNOS)

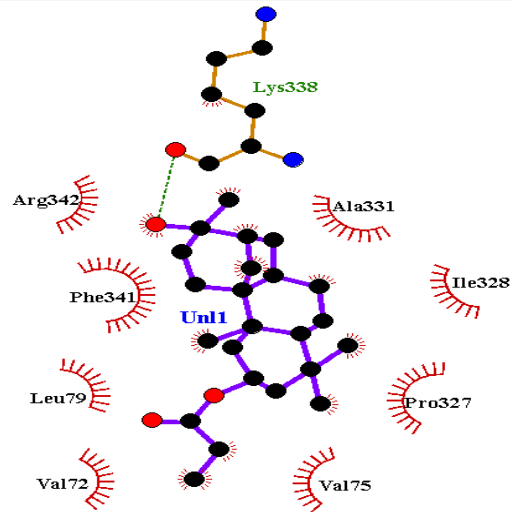


E- Opióide Delta

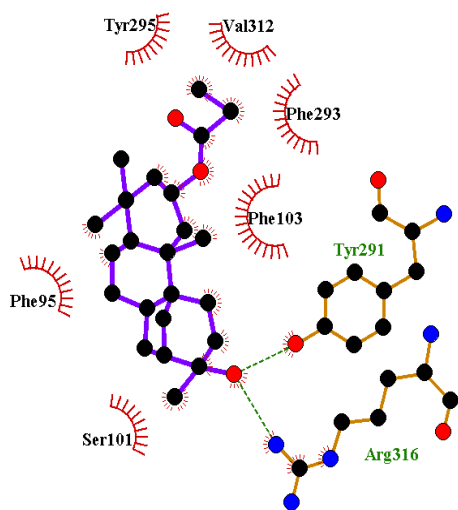
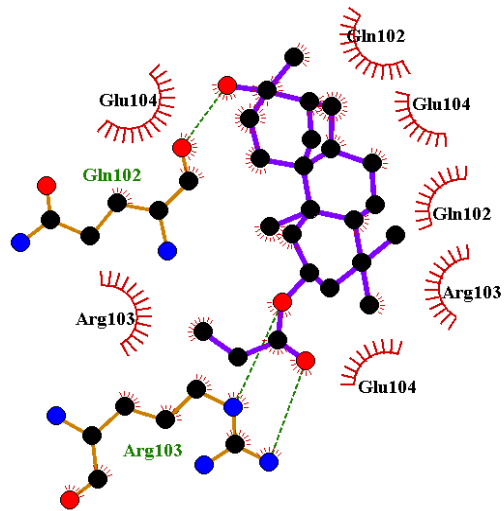


F- Opióide kappa

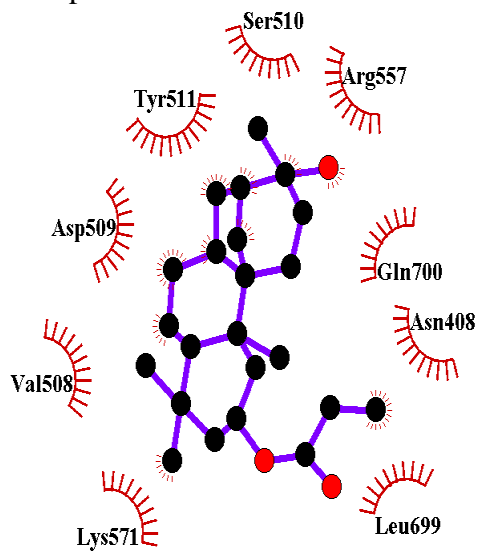




G-Opioide  $\mu$ 

## H- Receptor purinérgico (P2X7)

I-Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

### J- Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1(TRVP1)



**Fonte:** Autor (a). Dados da pesquisa,2021. **Legenda:** As ligações alvos proteicas ligantes com o SM-2:  = por Pontes Hidrofóbicas.  = por Pontes de Hidrogênio.



## CAPÍTULO II

### 2ª ETAPA NA UNIVERSIDADE DE TORONTO-UofT



Impact factor (2021):7.31 Journal Citation Reports  
(Clarivate, 2022): 52/246 (Oncology)

#### ESTUDO DE UM DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO SM-2 OBTIDO DA ESTEMODINA (Sm-1) NO CÂNCER DE LÍNGUA

Mykelly Gomes Alves, Graziella Rigueira Molska, Aiman Ali, Najmeh Esfandiari,  
Francisco Geraldo Barbosa, Jair Mafezoli, Mirna Marques Bezerra, Helláda  
Vasconcelos Chaves, Marco Magalhães.

#### Resumo

Para o estudo do carcinoma de células escamosas (CCE), modelos experimentais animais utilizando agentes químicos carcinógenos são relatados na literatura. Nesse estudo o uso do Óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO), foi escolhido por mimetizar alterações moleculares capazes de causar modificações genéticas e epigenéticas de lesões potencialmente malignas (LPM) e CCE. Devido à alta prevalência de carcinoma de células escamosas (CCE) e de terapêuticas ainda limitadas, a utilização do modelo experimental em roedores com agentes químicos carcinógenos como o agente químico 4-nitroquinolina (4-NQO) a fim de reproduzir CCE em língua em roedores similares às lesões ao tabaco em humanos é eficaz. **Objetivo:** investigar o efeito de um novo composto semissintético oriundo da Estemodina (Sm-1) no tratamento do CCE de língua. Um derivado diterpênico SM-2, cujos estudos anteriores mostraram efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório. **Metodologia:** foram utilizados 22 animais (camundongos C57/BL6) adultos com 10-12 semanas machos e fêmeas, da linhagem C57BL6 (machos e fêmeas), adquiridos do laboratório Jackson (*Bar Harbor, United States*). O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Toronto (*University of Toronto Animal Care Committee in accordance with the regulations of the Ontario Animal Research Act*) nº 6638 e ocorreu no período de 32 semanas, os mesmos receberam 4-NQO homogeneizado em água na concentração de 100 µg/ml, para consumo *add-libitum*, ou Propilenoglicol, por 10ª semanas consecutivas, retornando ao consumo regular de água após esse período. O monitoramento do consumo de água, ração e peso dos animais foi realizado toda semana por um período de 30

semanas. Na 8ª semana após a suspensão do 4NQO, iniciou-se o tratamento com SM-2 (oral 25 µg/kg ou tópico 500 µg/kg) ou veículo. Os animais foram eutanasiados na 20ª semana após a retirada do 4NQO, e a língua coletada para avaliação histopatológica. Observou-se que não houve redução significativa de peso dos animais tratados com SM-2 quando comparados ao grupo veículo. **Resultados:** A análise histopatológica mostrou que o grupo SM-2 (via oral) apresentou displasia grau leve ou alto, porém com nenhuma incidência de invasão do CCE. Já no SM-2 tópico, foram observados casos de displasia grau alto, porém apenas 10% invasão do CCE. **Conclusão:** O SM-2 via oral preveniu o surgimento de lesões neoplásicas na língua sugerindo um tratamento promissor para esta condição.

**Palavras-chaves:** Carcinoma de Células Escamosas, 4NQO, Estemodina, Inflamação.

## INTRODUÇÃO

Para o estudo do carcinoma de células escamosas (CCE) modelos baseados na administração de carcinógenos químicos são intensamente relatados na literatura, sendo o óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) o mais utilizado. O 4-NQO não está presente em condições naturais, pois é sintetizado quimicamente apenas para fins de pesquisa (Kanojia, Vaidya, 2006). Ele simula as alterações moleculares causados por agentes derivados do tabaco, causando modificações genéticas e epigenéticas suficientes para o desencadeamento de lesões potencialmente malignas (LPM) e CCE e suas sintomatologias associadas a depender da dose e do tempo de exposição.

O modelo 4NQO é atraente para estudos de quimioprevenção devido às suas características facilmente observáveis e amostragem de tecido para análises patológicas e moleculares (Kazuhisa I. et al., 2017), amplamente utilizado em roedores por ser muito útil para investigar os efeitos de drogas antitumorais (Li Q. et al., 2020) em diferentes estágios da carcinogênese oral. Nesse contexto, diferentes métodos de diluição e de aplicação foram desenvolvidos, sendo a oferta dessa substância 4-NQO através da sua mistura na água de beber dos animais a mais relatada (Nakahara et al., 1957; Ishida, 2017). Roedores especialmente ratos e camundongos, são os animais mais comumente usados na modelagem Carcinoma de células escamosas oral (CCEO), veem atraindo cada vez mais a atenção de estudiosos no campo de pesquisa CCE (LI et al., 2020).

Atualmente, é comum a utilização de terapias antineoplásicas para o tratamento do câncer, com destaque para a quimioterapia, radioterapia, hormônioterapia e cirurgia. Não obstante, nota-se que o emprego dessas técnicas possui uma série de efeitos colaterais

decorrentes de sua toxicidade, que afetam não apenas as células doentes, mas também os tecidos saudáveis. Assim, os efeitos adversos dos tratamentos tradicionais podem ser mitigados pelo uso das plantas medicinais, que possuem menores contraindicações, devido aos efeitos citotóxicos serem mais amenos. Combinado com as vantagens de haver grande disponibilidade de plantas, como é o caso do Brasil, o baixo custo para sua aquisição, a atividade anticancerígena dos constituintes à base de plantas é uma abordagem desejável para o manejo da doença (Assumpção et al.,2022; Ferreira RG et al.,2017; Souza MVN et al.,2007).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) planta medicinal é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (Brasil, 2019). Sob uma perspectiva farmacológica, muitos compostos já foram extraídos de fontes naturais, tiveram suas propriedades biológicas asseguradas e são amplamente utilizados como medicamentos. Dentre os exemplos clássicos, a morfina (de origem vegetal) e a penicilina (de origem microbiana) sucesso da medicina desde o último século quando foram desenvolvidas (Krishnamurti e Rao, 2016).

A utilização de plantas para o tratamento de diversas enfermidades, principalmente no Nordeste brasileiro é bastante difundido, especialmente nas cidades do interior, onde o sistema de saúde é precário e muitas vezes praticamente inexistente. Muitas espécies, mesmo descritas na medicina tradicional, não devem ser utilizadas pela população sem que haja conhecimentos científicos fundamental a pesquisa científica de identificação dos produtos naturais, incluindo aqueles responsáveis pelas propriedades terapêuticas das espécies brasileiras usadas na medicina popular, muitas vezes distinto dos relatos de uso tradicional dos povos originais indígenas (Bolzani,2016).

E o uso de compostos de origem vegetal podem ser considerados promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que o mecanismo de ação desses fitoquímicos, que estão presentes em amostras vegetais, ocorre por meio de interações com diversas moléculas, principalmente proteínas da membrana celular (Barrett et al., 2018), além de possuir propriedades moleculares que podem induzir a apoptose em diferentes células cancerígenas (Costa et al., 2020; Rajkumar et al., 2011; Raiana et al., 2013).

Em estudos realizados com compostos obtidos do extrato das folhas e raízes de *S. maritima* Linn (*S. maritima*) mostrou-se capaz de apresentar atividade anti-inflamatória promissora no combate ao estresse oxidativo e reabsorção óssea em ensaios *in vivo* de

periodontite (Teixeira et al., 2017). Também se evidenciou atividades anti-inflamatória e antioxidante do metabólito crenatosídeo, presente na raiz de *S. maritima*, sendo sua capacidade de sequestrar radicais livres semelhante à vitamina C, assim como outros metabólitos, tais como a estemodina, e estedinodisídeo B, apresentaram-se como agentes antimicrobianos (Silva et al., 2014).

O estudo analisou o efeito de um novo composto semissintético oriundo da Stemodina (Sm-1) no tratamento da carcinogênese do CCE de língua utilizando um derivado diterpênico estemodano SM-2, cujos estudos anteriores mostraram efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório. O projeto teve como objetivo a avaliação da atividade antitumoral e/ou anti-inflamatória do SM-2, no modelo de câncer de língua em camundongos.

## **METODOLOGIA**

### **Ensaio *in vivo***

Foram utilizados 22 animais (camundongos) adultos com 10-12 semanas, da linhagem C57BL6 (machos e fêmeas), sendo estes adquiridos do laboratório Jackson (*Bar Harbor, United States*). Todo o estudo ocorreu no período de 32 semanas acontecendo de acordo com as convenções internacionais no uso e manutenção de animais de laboratório e após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Toronto (*University of Toronto Animal Care Committee in accordance with the regulations of the Ontario Animal Research Act*) nº 6638.1.

### **O modelo de carcinogênese induzida por 4NQO**

O modelo de carcinogênese induzida pelo produto químico 4-nitroquinolona 1-óxido (4NQO), produz alterações moleculares e celulares semelhantes às observadas em indivíduos fumantes (Sagheer, 2021; Ishida et al., 2017). O produto com 4NQO era preparado semanalmente em solução estoque diluído no propilenoglicol (5 mg/ml) e mantido em temperatura de 4° C, até a homogeneização em água, sendo diluído na concentração de 100 µg/ml, que os camundongos receberam para consumo. O volume consumido era monitorado e a solução substituída semanalmente durante um período de 10ª semanas. O experimento ocorreu conforme a ordem cronológica seguinte: 1) indução química do tumor (4NQO); 2) registro do peso corporal semanal e avaliação da saúde dos

animais a cada 5 dias até o dia da eutanásia; 3) na 8ª semana após a suspensão do 4NQO iniciou-se o tratamento com SM-2 (oral ou tópico) ou veículo; 4) fotografia da língua macroscopicamente e averiguação de lesões; 5) retirada de tecido da língua para avaliação histomorfológica (Figura 1).

### Obtenção do produto derivado semissintético SM-2

A planta *S. maritima* foi coletada no município de Pentecoste, Ceará, em outubro de 2020, e seu uso para fins de pesquisa foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN cadastro nº ACEDEC6) para o estudo do seu efeito da crônica do câncer. A partir da estemodina (Sm-1), um composto isolado da planta, e após modificações químicas estruturais, obteve-se o derivado SM-2 que é um monopropanoato de estemodina, registrado na literatura como estemodinona. O derivado semissintético SM-2 foi desenvolvido pelos Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa e Prof. Dr. Jair Mafezoli, do Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) da Universidade Federal do Ceará (UFC) no Brasil. Os detalhes estruturais do derivado semissintético não podem ser apresentados no momento, uma vez que são objeto de patente.

### Administração das soluções

**Figura 1. Linha cronológica do protocolo experimental**



**Fonte:** autor,2022. **Legenda:** linha do tempo do modelo experimental com 4NQO.

Para a administração nos dois grupos controles, um grupo recebeu salina 1% por via oral (v.o.), e outro grupo controle recebeu o gel Mucolox via tópico na língua. Para a administração dos dois grupos de tratamento, um grupo recebeu o composto SM-2 +

salina (via oral), e o outro grupo recebeu a substância SM-2 em gel Mucolox. A administração iniciou-se na 10ª semana após a suspensão da aplicação do 4NQO, administrado por 12 semanas consecutivas. A divisão dos grupos experimentais ocorreu de forma randomizada: Grupo 1 – Controles (propileno glicol, v.o ou Mucolox gel via tópica n=6); Grupo 2 (4NQO) – SM-2 (25 µg/kg, v.o); Grupo 3 (4NQO) – SM-2 (gel 500 µg/kg, via tópica) e o grupo 4 (4NQO) - sem receber o tratamento.

O composto SM-2 foi diluído em salina 1% com Tween-80 para diluição. A solução-mãe foi armazenada no freezer -20° C em vial de vidro de 10 mL escurecido depois de preparada. Retiraram-se da solução-mãe alíquotas de 2,5 µL em microtubos de 2 mL, feito em média 20 alíquotas para serem utilizadas uma por dia de experimento nos dias corridos do experimento, depois preparava-se mais alíquotas, de acordo, com os dias. A preparação da solução de trabalho era feita diariamente sendo retirada a alíquota com 2,5 µL da solução-mãe de SM-2 e acrescentado 4,5 mL de salina. A substância passava pelo agitador para ser homogeneizada no microtubo âmbar de 5 mL, e, na sequência, era iniciada administração por via oral.

O outro grupo tratado com SM-2 recebeu a solução homogeneizada como uma pomada para uso tópico, também eram retiradas alíquotas da solução mãe na dose de 20µg+180µL de Mucolox, armazenada no tubo âmbar, levada para agitação e depois aplicada com auxílio de uma mini *scoop* em aço inoxidável para aplicar localmente na língua.

### **Processamento da Análise macroscópica por imagens fotográficas da lesão e análise histológica**

As imagens da língua foram adquiridas por fotografia ao longo do experimento e após a eutanásia e enviadas para dois patologistas especializados em medicina oral e patologia com foco na biologia celular do câncer. Os mesmos avaliaram e classificaram as lesões em displasia leve, displasia moderada, displasia severa e/ou carcinoma de células escamosas (figuras 2A e 2B). Para análise histológica, a língua foi emblocada em parafina, e cortes seriados foram realizados no micrótomo. Os cortes (5 µm) foram corados com hematoxilina e eosina, e posteriormente analisados com intuito de verificar a presença de infiltrados de células inflamatórias (CHADWICK et al., 2021).

O tratamento com 4NQO formou lesões na superfície dorsal da língua visíveis por análise macroscópica e fotografias para auxiliar a quantificar o número de lesões

formadas na superfície dorsal da língua (SAGHEER et al.,2021; BISETTO et al., 2018; CURRY et al., 2013; TAN et al., 2020).

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste de Shapiro-Wilk será utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentada com distribuição normal (dados paramétricos, teste para grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor  $>0.05$  para o teste de Shapiro-Wilk). Os dados paramétricos foram analisados através do teste de ANOVA de medidas repetidas. O pós-teste (post-hoc) para a ANOVA foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Em caso de homogeneidade de variâncias (p-valor  $\geq 0,05$ ), foi definido como pós-teste para a ANOVA de medidas repetidas o teste de Tukey.

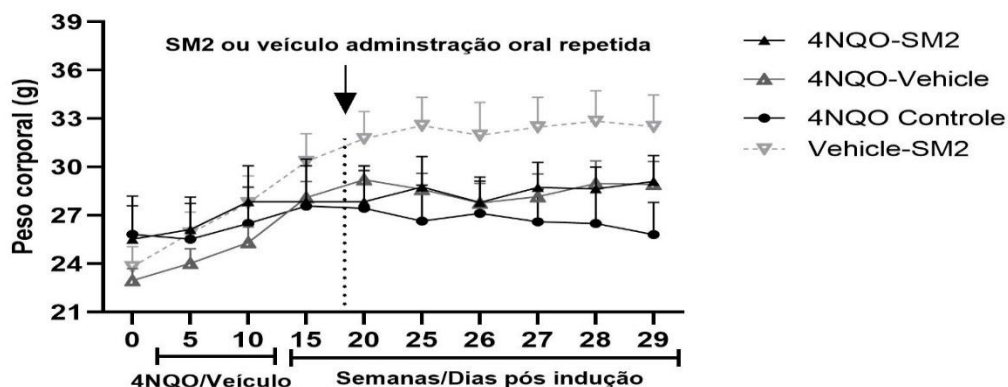
## **RESULTADOS**

### **Peso Ponderal dos animais durante o experimento**

Na análise das alterações de peso dos animais durante o experimento, nenhuma diferença estatisticamente significativa pôde ser observada em relação ao grupo veículo (Fig. 2A e 2B), no modelo de carcinogênese induzida por 4NQO e durante o período de tratamento com SM-2 (via oral ou tópica) dos camundongos C57BL6. Todos os animais receberam uma mistura de ração em pó rica em proteína (18%) após o aparecimento das lesões. Utilizamos essa dieta rica em proteínas para evitar a degradação da saúde geral, uma vez que o ato de roer o *pellet* de ração poderia induzir um comportamento doloroso. Essa dieta pode ter interferido com a perda de peso, por isso não observamos diferença entre os grupos.

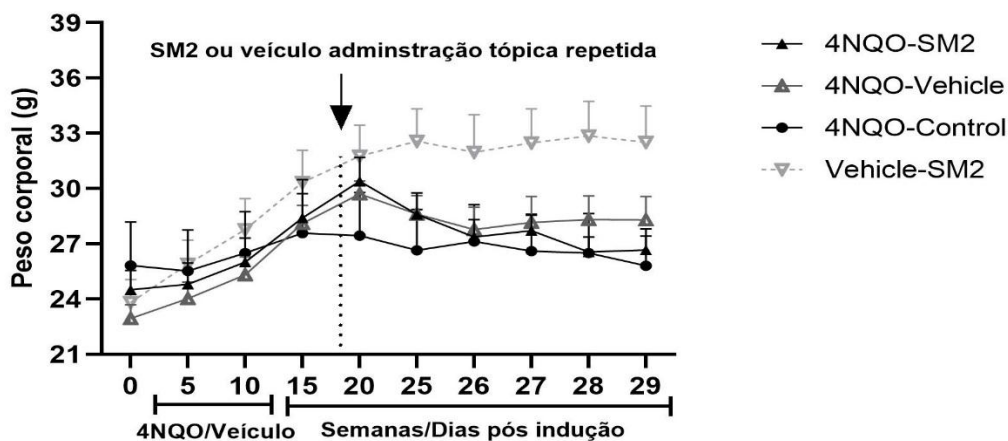
Os camundongos receberam 100 $\mu$ g/L de 4NQO diluído em 5mg/mL de propilenoglicol via água potável por 10 semanas, seguido por um período de mais 12<sup>o</sup>semanas após 4NQO, no total de 22<sup>a</sup> semanas de observação. Os pesos foram medidos semanalmente até o dia da eutanásia. Os dados estão apresentados nas em intervalos de 5 semanas, e a cada 2 dias após a 25<sup>a</sup> semana. Anova de medidas repetidas N.S.

**FIG.2A** – Gráfico 2A. Análise ponderal SM-2 por via oral de camundongos induzidos à carcinogênese experimental por 4NQO.



**Legenda das imagens: Fig.2A-** Peso corporal dos camundongos do grupo tratado SM-2 oral (v.o), comparativo com grupo controle e veículo 4NQO. O gráfico corresponde os registros dos pesos dos camundongos, durante e após o tratamento com 4NQO.

**FIG.2B** – Gráfico 2B. Análise ponderal SM-2 tópico local na língua de camundongos induzidos à carcinogênese experimental por 4NQO.

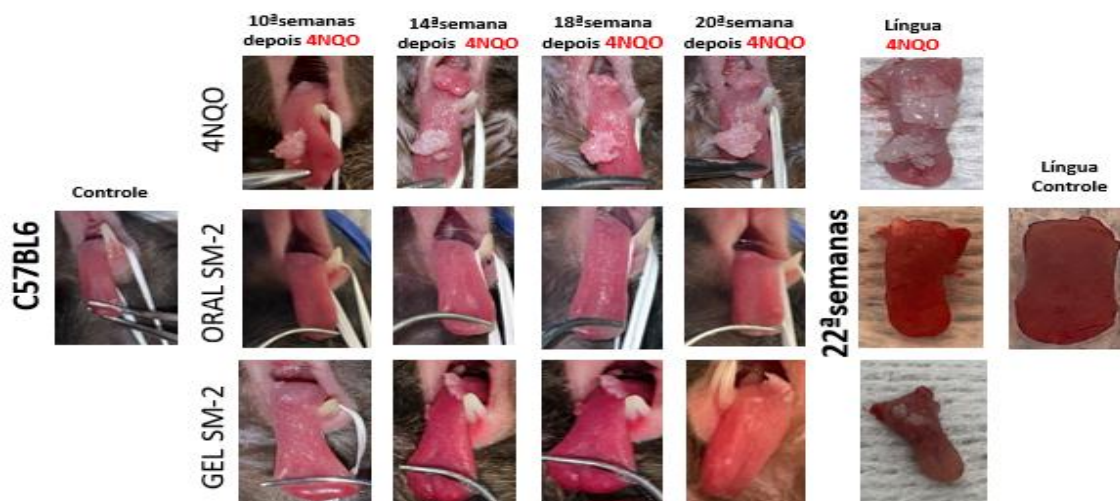


**Fig.2B-** Peso corporal dos camundongos do grupo tratado SM-2 gel (tópico), comparativo com grupo controle e veículo 4NQO. O gráfico com os registros dos pesos dos camundongos, durante e após o tratamento com 4NQO.

### Análise macroscópica por imagens fotográficas da lesão e análise histológica

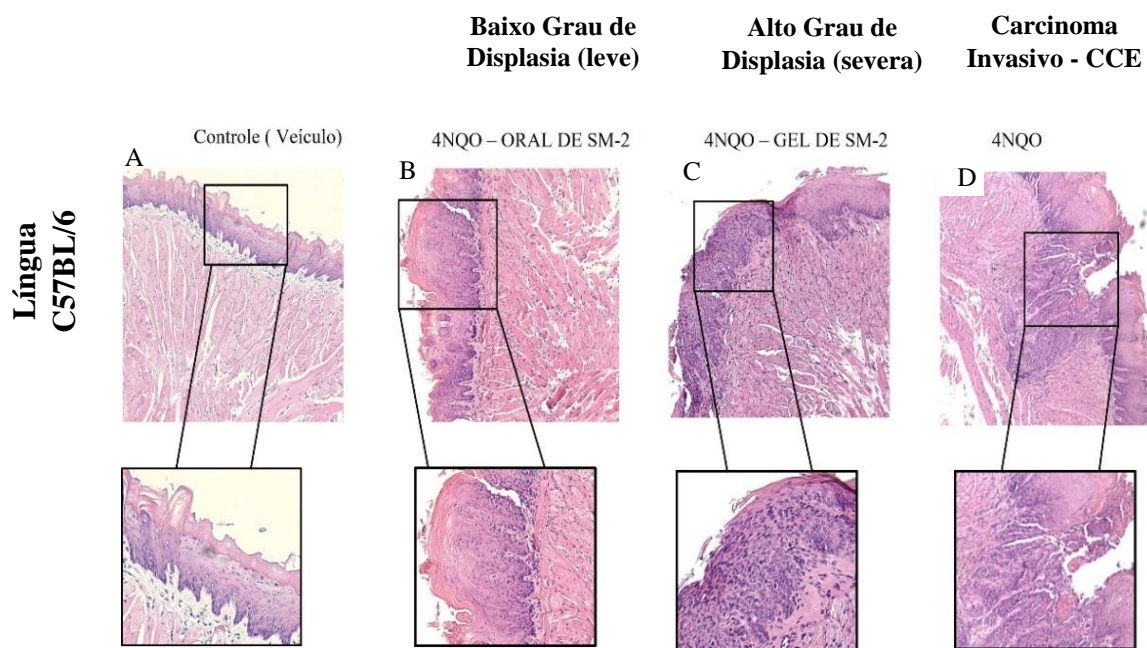
**Figura 3:** Efeitos do tratamento com 4NQO em camundongos WT (C57BL/6).





**Fonte:** Autor (a), 2022. **Legenda da Fig.3.** Registro das imagens representativas de língua e tecidos da língua de camundongos tiradas a partir 10ª semana após a suspensão do 4NQO. Durante o acompanhamento do tratamento com 4NQO, as imagens representam a 10ª semana, 14ª após 4NQO até a 18ª semana após o uso do 4NQO e fim do tratamento com SM-2 dos animais na 10ª semana após 4NQO, a partir da linha de base e no dia da eutanásia na 22ª semana do total de início do protocolo 4NQO. Os tecidos da língua foram retirados para análise macroscópica e morfohistopatológica (figura 4).

**Figura 4 – Análise Histopatológica das Lâminas do Experimento 4NQO**



**Fonte:** Autor (a), 2022. **Fig.4. Legenda das Figuras** – (A) a área focalizada por fotomicrografia mostra as células epiteliais escamosas completamente normais. (B) a área focalizada demonstra alterações displásicas leves e moderadas, que são consideradas de baixo grau essas alterações displásicas, que se estendem das camadas basais e parabasais até o ponto médio do revestimento epitelial, sendo caracterizada por Hiper Cromatismo nuclear, pleomorfismo e aglomerado celular. (C) nesta área focalizada tem nos tecidos

alto grau de displasia que se estendem por todo revestimento epitelial. **(D)** nesta área focalizada demonstra a invasão de células escamosas facilmente reconhecidas da lâmina própria para a camada mais profunda do tecido muscular. Todas as fotomicrografias acima das lâminas foram realizadas com microscópio Olympus BX51 e câmera SPOT RT3 utilizando o software básico SPOT 5.1 na ampliação total de 100X e 200X. As imagens correspondem à região de epitélio lingual de camundongos expostos ao 4-NQO. Coloração Hematoxilina e Eosina (H&E).

#### **Análise dos escores das lâminas da língua 4NQO**

Nas tabelas **1A** e **1B** está a análise patológica qualitativa realizada em cortes da língua coradas em H&E, usando um microscópio de Luz DM2000 (Leica) em 100X ampliação total. Displasia e carcinoma foram pontuadas de acordo com a classificação descrita na literatura (NEVILLE et al., 2015).

**Tabela 1A** - Frequência das lesões observadas na Língua do tratamento oral SM-2 comparado ao grupo controle (4NQO).

Diagnóstico Histopatológico	Oral SM-2 (4NQO) (n=9)	Grupo controle (4NQO) (n=9)
LG Displasia	4 (66,7%)	0(0%)
DA Displasia	2(33,3%)	6(44,4%)
CCE Invasivo	0(0%)	3(55,5%)

**Abreviações:** LG, leve grau displasia; DA, alto grau displasia; CCE, carcinoma de células escamosas. **Legenda da Tab. 1A**– Análise patológica qualitativa realizada em Cortes da língua de camundongos H&E, no tratamento oral com SM-2, utilizando microscópio de Luz DM2000 (Leica) com ampliação total de 100X.

Após a quantificação dos graus de displasia e carcinoma presentes na tabela **1A** e **1B**, foi observada uma redução de 100% de CCE invasivo na língua de animais que receberam 4NQO e foram tratados com SM-2 oral, comparado aos animais dos grupos 4NQO veículos/não-tratados.

**Tabela 1B - Língua do tratamento tópico SM-2 (4NQO)**

<b>Diagnóstico Histopatológico</b>	<b>Gel SM-2 (4NQO) (n=9)</b>	<b>Grupo controle (4NQO) (n=9)</b>
LG Displasia	0 (0%)	0(0%)
DA Displasia	4(90%)	6(44,4%)
CCE Invasivo	1(10%)	3(55,5%)

**Abreviações:** LG, leve grau displasia; DA, alto grau displasia; CCE, carcinoma de células escamosas. **Legenda da Tab. 1B** – Análise patológica qualitativa realizada em Cortes da língua de camundongos H&E, no tratamento oral com SM-2, utilizando microscópio de Luz DM2000 (Leica) com ampliação total de 100X. Após a quantificação dos graus de displasia e carcinoma presentes na tabela 1A e 1B, foi observado 10% de CCE invasivo na língua de animais que receberam 4NQO tratados com SM-2 gel e os casos de Displasia Alta ou moderada em torno de 90%, quando comparado aos animais dos grupos 4NQO veículos/não-tratados que tinham 55% de CCE invasivos e apenas 44,4% de DA displasia.

## **DISCUSSÃO**

O modelo de carcinogênese oral, induzido por 4NQO, é capaz de produzir displasias e carcinomas de células escamosas. Apesar do desenvolvimento de métodos mais tecnológicos de indução, o produto químico 4-NQO ainda se destaca como a principal substância utilizada para estudos de CCE oral, com ativação de proto-oncogenes e estresse oxidativo na região oral, devido ao acúmulo de alterações genéticas geradas pela metilação de bases nitrogenadas, seguida de alterações epigenéticas, que, embora sejam reversíveis, acumulam-se à medida que a exposição à droga persiste no organismo, mimetiza as alterações nucleares geradas pelo tabaco (Alves J.M.S et al., 2021; ISHIDA et al., 2017; Urvalek et al., 2015; Wallenius&Lekholm, 1973; BAILLEUL et al., 1989).

Como exemplo disso é a acetilação e a metilação de proteínas histonas, o que pode facilitar a transcrição de oncogenes (Li et al., 2020). O modelo escolhido no presente estudo corrobora os estudos mostrando a capacidade de indução de CCE invasivo em camundongos, bem como as alterações histopatológicas referentes ao uso do 4NQO (Li

et al., 2020). Sendo relevante para investigar a carcinogênese oral humana, incluindo o microambiente imune, e para avaliar agentes terapêuticos e quimiopreventivos (Bouaoud J et al.,2020). Assim, como no contexto dos medicamentos utilizados para tratamento do câncer, o paclitaxel (Taxol®) destaca-se como o grande caso de sucesso da semissíntese. Este composto é um potente agente anticâncer, foi descoberto em 1971, por Monroe E. Wall e Mansukh C. Wani, sendo extraído das cascas da espécie *Taxus brevifolia* (Oliveira,2021; Xião; Morris-Natschke e Lee, 2016).

O gênero *Stemodia* representado por cerca de 66 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América em áreas salinizadas. É um gênero de plantas de florescência, perenes com folhas dentadas e racemos de flores coloridas, que são geralmente, em tom roxo (HASSLER, 2017). Seus constituintes químicos apresentam grande variedade estrutural dentre os quais destacam-se os esteróides, flavonóides e terpenóides, principalmente diterpenos tipo estemodano. Seus compostos apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, gastroprotetora, anti-inflamatória, antiviral e anticâncer (Oliveria,2021; Fernandes,2020; Azevedo,2019; Souza,2017; Silva, 2013; Lamm et al., 2006).

Azevedo (2019) mostrou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do extrato etanoico das folhas de *S. maritima* e do diterpeno estemodina (Sm-1) em modelo de hipernocicepção inflamatória aguda na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Outro estudo foi utilizado dois derivados semissintéticos o SM-2 e SM-3, obtidos a partir de transformação química da Sm-1, um isolado da *S. maritima* Linn, em um modelo experimental de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM de ratos induzida por formalina, que após o estudo realizado, constatou que os dois semissintéticos estemodanos apresentaram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios também Diante da observância dos estudos de suas propriedades anti-inflamatórias e a pouca produção científica até o momento do novo composto diterpênico SM-2 (Fernandes,2020).

Recentemente, ficou constatado que extratos hexânicos das folhas desta espécie exibe atividade gastroprotetora em ratos, aumentando a concentração de Óxido nítrico (NO) e glutatona reduzida e diminuindo os índices de mieloperoxidase nos tecidos avaliados. Os autores afirmam que tal atividade deve-se à presença de compostos fenólicos e triterpenos no extrato (SOUSA et al., 2021).

As análises estatísticas do registro semanal do peso corporal dos animais não foram observadas diferenças com relação ao peso dos animais ao longo das 28 semanas de avaliação. Entretanto, o grupo veículo tratado com gel ou salina/SM-2 apresentou um aumento de peso em média ao longo do tempo, porém esse dado não difere estatisticamente de nenhum dos grupos que receberam 4NQO tratados com SM-2 ou sem tratamento, diferente do que geralmente é relatado na literatura no uso do modelo. Isso pode ter acontecido devido ao uso de uma ração hiper proteica, bem como ao número de animais que desenvolveram apenas lesões displásicas leves, não desenvolvendo o CCE invasivo.

Mostrando a eficácia desse modelo através das análises macroscópica e microscópica ao longo do protocolo experimental, foram encontradas alterações celulares displásicas progressivas à medida que a exposição ao carcinógeno parou na 10<sup>a</sup> semana de indução 4NQO até à eutanásia, chegando a provocar CCE de língua no grupo controle positivo 4NQO e um alto grau de displasia em outros animais do mesmo grupo. Observou-se que o grupo tratado com SM-2 por via oral apresentou um baixo grau de displasia em comparação ao controle positivo, e nenhum camundongo deste grupo desenvolveu CCE invasivo.

Um estudo realizado em diferentes células de câncer expostas a 25 µg de diversos derivados análogos da estemodina demonstraram uma diminuição ou uma inibição da proliferação celular. Os mesmos autores investigaram também o potencial de inibição de ciclooxigenases e lipooxigenases, e alguns dos derivados análogos demonstraram efetividade em inibir a ciclooxigenases 1 e a lipooxigenases (Russel et al., 2011), o que poderia contribuir para um possível efeito anti-inflamatório da estemodina e de seus análogos. Em um outro estudo modelo experimental sobre a atividade citotóxica *in vitro* da Sm-1, das oximas-E/Z e seus ésteres, frente às linhagens de células cancerígenas humanas (PC3, HCT-116, HL60 e SNB-19), mostrou resultados promissores para os ésteres OX1-Z1, OXI-E1, OXI-E2 e OXI-E3, com percentuais de inibição de crescimento celular ( $\geq 75\%$ ) superiores à estemodina e ao controle positivo (doxorrubicina) em pelo menos uma das linhagens testadas (Oliveira, 2021).

Algumas limitações foram encontradas no estudo, tais como: baixo número de animais por grupo, utilizamos apenas 5-6 animais por grupo e ainda ocorreram duas mortes ao longo do experimento, não relacionadas ao 4NQO. O início da administração do derivado semissintético (SM-2) tardio, visto que o tratamento foi iniciado na 8<sup>a</sup> semana após a retirada do 4NQO, o que pode ter interferido com a ação protetora mais evidente

do SM-2. Ademais, o tempo de duração do experimento *in vivo* que esse tempo de observação poderia ser prolongado até 34<sup>a</sup>semanas. Sendo o período nas quais possivelmente os animais com alto grau de displasia poderiam desenvolver CCE invasivo, evidenciando melhores resultados no final do protocolo experimental para análise.

Tornando importante na condução de estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* que investiguem tal potencial farmacológico contribuindo para o surgimento de novas abordagens terapêuticas com uso do SM-2 e sua aplicabilidade terapêutica no câncer.

## **CONCLUSÃO**

Estudos para bioprospecção de produtos à base de plantas com atividade biológicas ativas com ação ou potencial anticancerígena em sua constituição torna-se uma abordagem desejável para o manejo e tratamento do CCE, por diminuir riscos de reações adversas de toxicidade ao organismo humano. O tratamento com SM-2 50µg/kg v.o foi capaz de prevenir a transformação maligna de CCE reduzindo a gravidade da malignidade nas lesões displásicas na língua dos camundongos tratados com SM-2, administrado diariamente por 12 semanas foi capaz de prevenir a transformação maligna de células escamosas que induzem ao CCE. Instigando com isso, o desenvolvimento de novos estudos com SM-2 em uma dose maior ou por um tempo maior de duração do tratamento a fim de investigar todo potencial e mecanismo de ação para este efeito preventivo no CCE, evidenciado no presente estudo no tratamento oral.

## **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES**

Nada a declarar.

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Universidade de Toronto-UofT.

## **REFERÊNCIAS**

1. Albach DC, Meudt, HM e Oxelman B. Juntando as “novas” Plantaginaceae. *Sou J.Bot.*92,297-315. Doi: 10.3732/ajb.92.2.297(2005).
2. Brener S et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. Revisão de Literatura Carcinoma de células escamosas bucal. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(1): 63-69

3. Chadwick JW, Macdonald R, Ali AA, Glogauer M, Magalhaes MA. TNF $\alpha$  Signaling Is Increased in Progressing Oral Potentially Malignant Disorders and Regulates Malignant Transformation in an Oral Carcinogenesis Model. *Front Oncol.* 2021; 11:741013.
4. Chow, M.D. Laura Q.M. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 1, p. 60-72. *N Engl J Med* 2020; 382:60-72  
DOI: 10.1056/NEJMra1715715
5. Fernandes F.E.M. Estudo dos derivados semissintéticos SM-2 e SM-3 obtidos de *Stemodia maritima* Linn. Em ensaio pré-clínico de dor na ATM de ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará-UFC, *Campus Sobral-CE*.2020.
6. Gonçalves Vde P, Ortega AA, Guimarães MR, Curylofo FA, Rossa Junior C, Ribeiro DA, Spolidorio LC. Chemopreventive activity of systemically administered curcumin on oral cancer in the 4-nitroquinoline 1-oxide model. *J Cell Biochem.* 2015 May;116(5):787-96. Doi: 10.1002/jcb.25035. PMID: 25510836.
7. Hassler, M. Roskov, Y., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P.M., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decock, W., De Wever, A., Nieukerken, E. Van, Zarucchi, J. ---amp--- Penev L. *World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World.* (eds.) 2018: Species 2000 ---amp--- ITIS Catalogue of Life, 31st July 2018. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). Species 2000: ISSN 2405-8858.
8. Inca. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Detecção precoce do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2021. <https://www.inca.gov.br>
9. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob Induc Dis.* 2019 Apr 12;17:29. doi: 10.18332/tid/105844. PMID: 31582940; PMCID: PMC6752112.
10. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006 Aug;42(7):655-67. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.10.013. Epub 2006 Jan 30. PMID: 16448841.
11. Krishnamurti C, Rao SC. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J Anaesth.* 2016 Nov;60(11):861-862. doi: 10.4103/0019-5049.193696. PMID: 27942064; PMCID: PMC5125194.
12. Liu YC, Ho HC, Lee MR, et al. Cortactin is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma and its overexpression is involved in oral carcinogenesis. *Environ Toxicol.* 2017;32(3):799-812.
13. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016 Mar;91(3):386-96. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.12.017. PMID: 26944243

14. Nakahara W, Fukuoka F, Sugimara T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gann* 1957; 48:129-136.
15. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016; 79(3): 629–66.
16. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Squamous Cell Carcinoma. In: *Oral and Maxillofacial Pathology*. 4th ed. Missouri, USA: Elsevier, 2016.
17. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2014;19(3):423-30. doi: 10.1007/s10147-014-0689-z. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24682763.
18. OMS. Organização Mundial da Saúde. Medicines: International Cooperation and Harmonization. Organização Mundial da Saúde; OMS,2011.
19. Rivera, M. C. A. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Morphol.*, 30(1):309-314, 2012.
20. Sousa R.S. Investigação dos efeitos neurofarmacológicos de *Stemodia maritima* (linn): alterações comportamentais e avaliação do estresse oxidativo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará. Sobral, . 81f. 2017.
21. Sousa, RS de.; Silva, J. de AG.; Borba, EF de O. .; Ramos, KR de LP.; Silva, CJA da.; Silva, PA da.; Silva, MG de F. .; Ramos, BA.; Mendes, RFV.; Silva, T.G. Efeito antioxidante e gastroprotetor do extrato de acetato de etila de *Stemodia maritima* L. em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. *Investigação, Sociedade e Desenvolvimento, [S. l.]*, v. 10, n. 15, pág. 2021.
22. Silva D.P.D. Extratos de plantas medicinais do gênero piper como método de tratamento para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). 2017. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -Instituto de Saúde de Nova Friburgo, Universidade Federal Fluminense, 2017.
23. Souza MVN, Pinheiro AC, Ferreira ML, Gonçalves RSB, Lima CHC. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. *Rev Fitos.* 2007; 3:25-42. [Link].
24. Schlumpf M, Fischer C, Naehrig D, Rochlitz C, Buen M. Results of concurrent radio-chemotherapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in everyday clinical practice with special reference to early mortality. *BMC Cancer*,2013
25. Urvalek AM, Osei-Sarfo K, Tang XH, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Identification of Ethanol and 4-Nitroquinoline-1-Oxide Induced Epigenetic and Oxidative Stress Markers During Oral Cavity Carcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 Aug;39(8):1360-72. doi: 10.1111/acer.12772. PMID: 26207766; PMCID: PMC4597780.



26. Wani, M.H.L. Taylore, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. MC Phail. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 93 (1971), pp. 2325-2337. 1971.
27. Wallenius K.; Lekholm U. Câncer oral em ratos induzido pelo carcinógeno solúvel em água 4-nitroquinolina N-óxido. Odontol Revy. 1973;24(1):39-48. PMID: 4514062.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Stemodia maritima* Linn. é uma planta popular conhecida no Nordeste brasileiro. Por meio de estudos do extrato etanólico das folhas *S. maritima*, foi capaz obter um derivado estemodano, a estemodina (Sm-1), biologicamente ativo, através do qual se obteve um novo diterpeno bioativo isolado e purificado, denominado SM-2, alvo do presente estudo. O SM-2, portanto, despertou interesse no desenvolvimento de estudos para o tratamento de doenças de origem inflamatória, para dor aguda e crônica, e no câncer de língua em modelos animais com roedores. Os resultados no presente estudo no câncer de língua induzido quimicamente por 4NQO em camundongos mostraram que SM-2 via oral reduz CCE, sendo um agente promissor em sua terapêutica.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015.

AIBACH DC, MEUDT, HM e OXELMAN B. Juntando as “novas” Plantaginaceae. *Sou J.Bot.*92,297-315. Doi: 10.3732/ajb.92.2.297(2005).

ALVES. J. M. S. Avaliação das alterações comportamentais e nociceptivas em um modelo experimental de carcinogênese oral em ratos. 2021. 59 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2021.

ALVES JMDS, VIANA KF, PEREIRA AF, LIMA JÚNIOR RCP, VALE ML, PEREIRA KMA, GONDIM DV. Oral carcinogenesis triggers a nociceptive behavior and c-Fos expression in rats' trigeminal pathway. **Oral Dis**. Mar 4, 2022.

ASSUMPÇÃO ICP, SILVA BA DE C E, MENDES MF. Bioprospecção de plantas medicinais com potencial anticancerígeno no Brasil: caracterização e métodos de extração. **Rev Fitos [Internet]**. 4º de março de 2022.

ATTY ATM, JARDIM BC, DIAS MBK, MIGOWSKI A, TOMAZELLI JG. *Oncology-PANEL: Tool for Management*. Ed.2020.

AZEVEDO, J. L. M. Efeito do extrato etanólico das folhas da *Stemodia marítima* Linn e do diterpenos estemodina em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda na articulação temporomandibular de ratos. Dissertação (**Mestrado em Ciências Morfofuncionais**) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, *Campus* Fortaleza, 2019. 85 f.

BAILLEUL, B. et al., Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. **Japanese journal of cancer research**, v. 80, n. 8, p. 691-697, 1989.

BANERJEE P, ECKERT AO, SCHREY AK, PREISSNER R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res**. 2 Jul 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretoria colegiada instrução normativa** - in nº 39, de 21 de agosto de 2019 (\*). Dispõe sobre as boas práticas de fabricação complementares a Fitoterápico,2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. –156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (**Cadernos de Atenção Básica**; n. 31). Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BARROS, M. E. S. B. Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-) - massoiactona e da combretastatina A-4 / Maria Ester de Sá Barreto Barros. – 2015. 128 f.: fig., tab. Orientador: Paulo Henrique Menezes. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. **Química Fundamental**. Recife,2015.

BOUAOUD J, DE SOUZA G, DARIDO C, TORTEREAU A, ELKABETS M, BERTOLUS C, SAINTIGNY P. The 4-NQO mouse model: An update on a well-established in vivo model of oral carcinogenesis. **Methods Cell Biol.** 2021.

BOLZANI.V.S. Meladina do Nordeste, a riqueza molecular de uma espécie de uso popular pouco estudada. Professora Titular do IQAr-Unesp, Vice-Presidente da SBPC e membro da coordenação Biota-Fapesp. **Ciência na rua.net** /Set 3,2016.

COSTA A.R. et al. Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts, **South African Journal of Botany**, Volume 135,2020.

CHADWICK JW, MACDONALD R, ALI AA, GLOGAUER M, MAGALHAES MA. TNF $\alpha$  Signaling Is Increased in Progressing Oral Potentially Malignant Disorders and Regulates Malignant Transformation in an Oral Carcinogenesis Model. **Front Oncol.** 2021; 11:741013.

CHEN, B. L.; WANG, Y. J.; GUO, H.; ZENG, G. Y. Design, synthesis, and biological evaluation of crenatoside analogues as novel influenza neuraminidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, p. 199-205, 2016.

CHI, A. C., & NEVILLE, B. W. Surface Papillary Epithelial Hyperplasia (Rough Mucosa) is a Helpful Clue for Identification of Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma. **Head and neck pathology**, v. 9, n. 2, p. 244–252, 2015.

CHOW, L. Q. M. Head and Neck Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020.

DOUROS, J., SUFFNESS, M. 1980. New Anticancer Drugs. In: Carter, S., Sakurai, Y. (Eds.), Resultados Recentes na Pesquisa do Câncer #70: **Quarta Revisão Anual do Programa Simpósio de Fase I e II em Ensaios Clínicos**, Tóquio, Japão, 5 a 6 de junho de 1978.

FERNANDES. F.E.M. Estudo dos derivados semissintéticos SM-2 e SM-3 obtidos de *Stemodia maritima* Linn. Em ensaio pré-clínico de dor na ATM de ratos. **Universidade Federal do Ceará-UFC**, Campus Sobral-CE.2020.

FUKUMASU, H. et al. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

FRESE KK, TUVESON DA. Maximizing mouse cancer models. **Nat Rev Cancer.** (2007) 7:645–58. Doi: 10.1038/nrc219

FLÓRIO, V. Raízes do estar bem. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 17-18, 2019.HANSON, J. R. (2018). Skeletal rearrangements of rings C and D of the kaurene and beyerene tetracyclic diterpenoids. *Journal of Chemical Research*, 42(4), 175-180.HASSLER, M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World. In: ROSKOV, Y. et al. (Eds.). **Leiden: Naturalis**, 2017.INCA. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estatísticas de câncer. Brasília, DF[**internet**] 2021.

GODOY, B. R. B. *Molecular Docking*: o aliado na busca por medicamentos contra o SARS-CoV-2. **Revista Blog do Profissão Biotec**, v. 8, 2021.

IPNI - Índice Internacional de Nomes de Plantas e Lista de Verificação Mundial de Famílias de Plantas Seleccionadas [internet] 2021.

JI C, SVENSSON F, ZOUFIR A, BENDER A. eMolTox: prediction of molecular toxicity with confidence. **Bioinformatics**. 2018.

KANOJIA D, VAIDYA MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol**. Epub 2006.

KAZUHISA.I et al., Modelos atuais de carcinoma de células escamosas de camundongo: modelos induzidos geneticamente e quimicamente. **Oncologia Oral**. Volume 73, outubro, páginas 16-. 20 de 2017.

KHANDELWAL AR, MOORE-MEDLIN T, EKSHYYAN O, GU X, ABREO F, NATHAN CO. O complexo curcumina C3 local e sistêmico inibe a tumorigênese oral induzida por 4NQO *via* modulação da ativação de FGF-2 / FGFR-2. **Am J Cancer Res**. 2018; 8 (12): 2538-2547. 2018.

K. RAINA, A. TYAGI, D. KUMAR, R. AGARWAL, C. Agarwal. Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, 61 (2013), pp. 187-195

KRISHNAMURTI, C.; RAO, S. C. The isolation of morphine by Sertürner. **Indian Journal of Anesthesia**, [s. l.], v. 60, n. 11, p 861- 862, 2016.

LAM.DK D. D., ZHANG J., JOHN C. D. SCHMIDT B.L. Novos Modelos animais de dor aguda e crônica do câncer: um papel fundamental para PAR2. **J Neurosci**. 10 de outubro de 2012

LAMM, A.; REYNOLDS, W.F.; REESE, P.B. Bioconversion of Stemodia maritima diterpenes and derivatives by *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Phytochemistry**, 67: 1088-1093.2006.

LEONELLI, F.; MIGNECO, L. M.; VALLETTA, A.; MARINI BETTOLO, R. Stemodane Diterpenes and Diterpenoids: Isolation, Structure Elucidation, Biogenesis, Biosynthesis, Biological Activity, Biotransformations, Metabolites and Derivatives Biological Activity, Rearrangements. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n.9, p. 2761, 2021.

LI Q, DONG H, YANG G, SONG Y, MOU Y, NI Y. Mouse Tumor-Bearing Models as Preclinical Study Platforms for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Front Oncol**. 2020.  
LI Q, et al., Modelos com tumor de camundongo como plataformas de estudo pré-clínico para carcinoma de células escamosas oral. **Front Oncol**. 2020.

LI WH, QIU Y, ZHANG HQ, LIU Y, YOU JF, TIAN XX, FANG WG. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. **Br J Cancer**. 2013  
LIPINSKI, C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LU Y, LI L, CHEN H, ET AL. Peroxiredoxin1 Knockdown inibe a carcinogênese oral através da indução da senescência celular dependente da mitofagia. **Onco Targets Ther.** 2021; 14: 239-251. Publicado 2021 de 12 de janeiro.

MARUR, S., FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 3, p. 386-396, 2016.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S. AND OLSON, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry** 16: 2785-91.2009.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.** 2016; 79(3): 629–661.

OECD (2008), Teste No. 425: Toxicidade Oral Aguda: Procedimento Up-and-Down, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>. Opções de exportação: **EndNote, Zotero, BibTeX, RefWorks, Procite, Import into RefWorks, Mendeley.**

OLELA.B; MBRAIA.J; WACHIRA.T; MORIASI.G. Research Article. Acute Oral Toxicity, Anti-inflammatory, and Analgesic Effects of Aqueous and Methanolic Stem Bark Extracts of *Piliostigma thonningii*. (**Schumach.**) Ed.2020.

OLIVEIRA, L.A.R.; MACHADO, R.D.; RODRIGUES, A.J.L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. Universidade Estadual de Goiás, UNUCET, Curso de Farmácia, 2 Universidade Estadual de Goiás, UNUCET. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.1, p.32-40, 2014

OLIVEIRA, JOSÉ AUGUSTO CARNEIRO DE. Semissíntese de compostos bioativos a partir de produtos naturais: obtenção de derivados da estemodina / José Augusto Carneiro de Oliveira. Dissertação (mestrado). **Universidade Federal do Ceará-UFC**,103 f.: il. Color – 2021.

OMURA, K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Oncol** 19, 423–430 (2014).

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. **Genebra, 2002.**

OMS 2011. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Medicines: International Cooperation and Harmonization. **Organização Mundial da Saúde**; 2011.

RASCHKA, Sebastian. Molecular docking, estimating free energies of binding, and AutoDock's semi-empirical force field. 2014.

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014.

RIBEIRO S, SCHMIDT AP, SCHMIDT SRG - O Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica Não Oncológica: O Papel da Metadona. **Rev Bras Anesthesiol** 2002; 52: 5: 644 – 651.

RIES LAG, HANKEY BF, MILLER BA, et al. Revisão das Estatísticas do Câncer 1973-1988. **Instituto Nacional do Câncer**. Publicação do NIH nº91-2789,1991.

RIVERA, M. C. A. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Morphol.**, 30(1):309-314, 2012.

RODRIGUES, F. E. A. LIMA, J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, J. N.; SANTIAGO, G. M. P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. M. C. Diterpene and other constituents from *Stemodia maritima* (Scrophulariaceae). **Jornal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1581-1586, 2010.

ROGÉRIO, M.E.F., et al. ADME-Tox Prediction and Molecular Docking Studies of Two Lead Flavonoids From the Roots of *Tephrosia Egregia* Sandw and the Gastroprotective Effects of Its Root Extract in Mice. **BIO Integration**, 3(2), 43-52. (2022)

RUSSELL, F. A. et al. Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 72, n. 18, p. 2361–2368, 2011.

SILVEIRA.D. F Receptores de opioides e hemeoxigenase-1 antinocicepção mediada da enzima de heme periférica de derivado semissintético (mc-h) obtido de *Moringa oleifera* Lam. Flores na Articulação Temporomandibular de ratos.73f.f.il.color. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. **Universidade Federal do Ceará-UFC**. Brasil,2017.

SANTOS, M.G., and CARVALHO, A.C.B. Plantas medicinais: saberes tradicionais e o sistema de saúde. In: comps. Saberes tradicionais e locais: reflexões etnobiológicas [online]. Rio de Janeiro: **EDUERJ**, 2018.

SAGHEER SH et al. 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma. **Methods Cell Biol.** 2021.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141–153, 2015.

SWANGO PA. Cânceres da cavidade oral e faringe nos Estados Unidos: uma visão epidemiológica. **J Public Health Dent**, 1996:56:309-318.

SOUSA, RS de SILVA, J. de AG. BORBA, EF de O. RAMOS, KR de LP. SILVA, CJA da.; SILVA, PA da.; SILVA, MG de F. ; RAMOS, BA.; MENDES, RFV.; SILVA, T.G. Efeito antioxidante e gastroprotetor do extrato de acetato de etila de *Stemodia*

maritima L. em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 10, n. 15, pág. 2021.

SILVA, W. M. B. et al. New volatile constituents from leaves of *Stemodia trifoliata* (Link.) Reichb. (Schrophulariaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 1, p. 37-41, 2009.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013.

SILVA, F.R.L. Contribuição ao estudo de *Tephrosia toxicaria* Pers.(Fabaceae) e *Stemodia maritima* Linn (Scrophulariaceae). Estudo químico e atividades biológicas. Dissertação (mestrado) / Francisca Renata Lopes da Silva.105f. **Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza** – 2013.

SILVA, F. R. L. *Tephrosia toxicaria* Pers. e *Stemodia maritima* Linn. Estudo químico e atividades biológicas. / Francisca Renata Lopes da Silva. – 2017. 203 f.: il. Color. Tese (doutorado) – **Universidade Federal do Ceará**, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

SILVA, DIEGO POLLO DUTRA da. Extratos de plantas medicinais do gênero piper como método de tratamento para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB).2017. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina). **Instituto de Saúde de Nova Friburgo**, Universidade Federal Fluminense, 2017.

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **4.ed. Porto Alegre**: ed. UFRGS, 2002.

SYLVIE BRENER, FRANCA ARENARE JEUNON, ALVIMAR AFONSO BARBOSA, HELENICE DE ANDRADE MARIGO GRANDINETTI. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. Revisão de Literatura Carcinoma de células escamosas bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2007.

TEIXEIRA AH, FREIRE JMD, DE SOUSA LHT, PARENTE AT, DE SOUSA NA, ARRIAGA AMC, LOPES DA SILVA FR, MELO IM, CASTRO DA SILVA II, PEREIRA KMA, GOES P, COSTA JJD, CRISTINO-FILHO G, PINTO VDPT, CHAVES HV AND BEZERRA MM. *Stemodia maritima* L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model. Doi: 10.3389/fphys.2017.00988. **Front. Physiol.** 8:988. 2017.

TROTT, O; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem.** 2010;31(2):455-461. doi:10.1002/jcc.2133

URVALEK, A. M., *et al.* Identification of Ethanol and 4-Nitroquinoline-1-Oxide Induced Epigenetic and Oxidative Stress Markers During Oral Cavity Carcinogenesis. Alcoholism, **clinical and experimental research**, v. 39, n.8,p. 1360–1372, 2015.



VAL, D.R., CHAVES, H.V., GOMES, F.I.F. et al. The semi-synthetic molecule [4",5"] dihydro-obovatin isolated from *Tephrosia Toxicaria* pers reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats. **Med Chem Res** **27**, 1004–1012 (2018).

V. RAJKUMAR , G. GUHA , ASHOK KUMAR. Atividade antioxidante e antineoplásica de extratos de *Picrorhiza kurroa*. **Food and Chemical Toxicology** ,**49**(2011),pp .36-39

WANI, M.H.L. TAYLORE, M.E. WALL, P. COGGON, A.T. MC PHAIL .The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.** 93 (1971), pp. 2325-2337. 1971.

WALLENIUS, K., LEKHOLM, U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. **Odontol Revy**, v. 24, p. 39–48, 1973.

WHO. World Health Organization. Guide to early cancer diagnosis [Internet]. **Geneve: WHO**; 2017.

XIAO, Z.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. Strategies for the optimization of natural leads to anticancer drugs or drug candidates. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 32-91, 2016.

YI-SHOU LIANG, MING-JER JUNG, SHENG-CHIEH WU, YUI-CHING KAO AND JENN-CHE WANG. *Stemodia* L. (Scrophulariaceae), a Newly Naturalized Genus in Taiwan. **Taiwania**, 56 (1): 62-65, 2011.

ŽITEK T, DARIŠ B, FINŠGAR M, KNEZ Ž, BJELIĆ D, HRNČIČ MK. The Effect of Polyphenolics in Extracts from Natural Materials on Metabolic Activity of Metastatic Melanoma WM-266-4 **Cells Appl Sci**. 2020; 10(10): 3499.

**ANEXOS DO PROJETO  
DE PESQUISA**

## ANEXO I

## MODELO PARA NORMAS DA REVISTA



Editor-chefe: Prof. Christoph Plass  
 Fator de impacto (2021): 7,316  
 Journal Citation Reports (Clarivate, 2022): 52/246 (Oncologia)  
 ISSN online: 1097-0215  
 © UICC

**Diretrizes do autor****LINKS RÁPIDOS**

[Formulário de acordo do autor \[mediante aceitação\]](#)  
[Serviços do autor](#)  
[Formulário de confirmação de linha de celular](#)  
[Submissão on-line \[req\]](#)  
[Política de acesso público do NIH](#)  
[Mais desta revista/IJC Cobertura de sequenciamento e estatísticas de qualidade Folha de estilo](#)  
[IJC EndNote](#) (o link para download não funciona com todos os navegadores, use Firefox ou Safari)

**DIRETRIZES****1. OBJETIVOS E ESCOPO****2. TIPOS DE MANUSCRITO**

2.1. Artigos de pesquisa e relatórios curtos

2.2. Comentários

2.3. Cartas ao Editor

2.4. Relatórios especiais

**3. PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO**

3.1 Texto do manuscrito

3.2 Referências

3.3 Tabelas

3.4 Figuras

3.5 Resumo gráfico

3.6 Material complementar

**4. SUBMISSÃO DO MANUSCRITO**

4.1 Submissões originais

4.2 Submissão de manuscritos revisados

**5. POLÍTICAS**

5.1 Autenticação de linhas celulares e teste de micoplasma

5.2 Autoria

5.3 Padrões de melhores práticas

5.4 Disponibilidade de dados

5.5 Servidores de pré-impressão

5.6 Integridade científica

**6. PROCESSO EDITORIAL**

6.1 Submissão

6.2 Processo de revisão

6.3 Apelação e refutações

**7. INFORMAÇÕES SOBRE ACEITAÇÃO**

- 7.1 Direitos autorais
- 7.2 Formulário de acordo do autor
- 7.3 Artigos aceites
- 7.4 Provas
- 7.5 Visualização antecipada
- 7.6 Acesso aberto
- 7.7 Separações
- 7.8 Nota para bolsistas do NIH
- 8. INFORMAÇÕES PARA PUBLICAÇÃO**
- 8.1 Tarifas de páginas
- 8.2 Tarifas de cores
- 8.3 Apoio à preparação do artigo
- 8.4 Apoio à promoção do artigo
- 9. CONTACTOS**
- 9.1 Gabinete Editorial
- 9.2 Editora
  
- 10. REFERÊNCIAS**

## ANEXO II

## CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DO PROJETO UofT- CANADÁ



University Health Network

Toronto General Hospital Toronto Western Hospital Princess Margaret Hospital

Animal Care Committee

June 7<sup>th</sup>, 2022

Dr. Marcos A Magalhaes

Dear Dr. Magalhaes,

**Re: AUP # - 6638.1 - 4NQO induced oral carcinogenesis in mice model**

The University Health Network, Animal Care Committee approved your Animal Use Protocol application.

**Date of Approval: June 2<sup>nd</sup>, 2022**

Please note the **AUP # 6638.1** must be quoted when placing animal orders with the Animal Resources Centre. Animal ordered under this protocol must only be used for this approved project and please note that commencement of work within the vivarium is contingent upon the availability of space.

**This protocol will expire 2023-03-11.**

Sincerely,

Dr. Tracy McGaha, PhD.  
Co Chair, Animal Care Committee.  
University Health Network/Princess Margaret Hospital.

---

**Please note:** All Animal Care related correspondences should be addressed to: ARC, c/o Lih Ling Chung, 6<sup>th</sup> Floor, MaRS – Toronto Medical Discovery Tower, 101 College Street, Toronto, ON., M5G 1L7.

## ANEXO III

## CERTIFICAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO CEUA-UFC



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Av. Comte. Maurocéllo Rocha Pontes, 100, Derby  
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE  
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Estudo dos derivados semi-sintéticos BS1 e BS2 obtidos de *Stemodia maritima* em ensaio pré-clínico de dor na ATM de ratos**, registrada com o nº 11/18, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Helliada Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 04/12/2018.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/01/2019 até 01/11/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	325
Peso/Idade	180-220 g / 2-3 meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 06 de dezembro de 2018.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA