



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

AMANDA DE OLIVEIRA FREITAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NA CARCINOGENESE ORAL
INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO EM CAMUNDONGOS.**

FORTALEZA

2024

AMANDA DE OLIVEIRA FREITAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NA CARCINOGENESE ORAL
INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO EM CAMUNDONGOS.

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Coorientador: Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

FORTALEZA

2024

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)

- F936a Freitas, Amanda de Oliveira.
Avaliação do efeito do resveratrol na carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina 1-óxido em camundongos. / Amanda de Oliveira Freitas. – 2024.
64 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.
1. resveratrol. 2. apoptose. 3. carcinogênese. I. Título.

CDD 610

AMANDA DE OLIVEIRA FREITAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NA CARCINOGENESE ORAL
INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO EM CAMUNDONGOS.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Área de concentração: Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Coorientador: Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Coorientador)
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dr. Manoel Odorico De Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ronildo Lins do Carmo Filho
Faculdade Paulo Picanço (FACPP)

RESUMO

O Resveratrol (RSV) é um produto natural que apresenta potencial na quimioprevenção do câncer através de diversos alvos moleculares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do RSV na iniciação e progressão tumoral em modelo animal de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO). Para isso, 60 camundongos *Swiss* foram submetidos à aplicação de 4NQO1% sobre a superfície de língua, cinco vezes na semana, por 20 semanas. Os animais foram divididos em seis grupos: grupo controle negativo (GCN); grupo controle RSV (GCRSV); grupo controle positivo (GCP) com 4NQO; e três grupos experimentais: 4NQO com RSV por 6 semanas (RSV6), 4NQO com RSV por 10 semanas (RSV10) e 4NQO com RSV por 20 semanas (RSV20). O RSV foi administrado na dose de 8mg/kg/dia por gavagem. Os animais foram eutanasiados após 20 semanas para excisão das línguas e posterior análise histológica. Coleta de sangue e de órgãos foi realizada para análise de toxicidade. Para todos os resultados foi considerado o nível de significância $p < 0,05$. A exposição ao 4NQO promoveu alterações macroscópicas em língua, como elevações e placas, e microscópicas, com o desenvolvimento desde carcinoma microinvasor até invasão extensiva dos tecidos ($p < 0,001$). A análise hematológica revelou leucocitose significativa em todos os grupos em contato com o 4NQO ($p < 0,001$). No que tange à toxicidade sistêmica, a não exposição ao 4NQO implicou em ganho significativo de massa corpórea ($p < 0,001$). Observou-se alterações microscópicas em esôfago, intestino e fígado. Na comparação entre grupos, foi observada alteração significativa na massa do fígado, rim e baço. Conclui-se que o presente modelo é capaz de desenvolver alterações epiteliais em língua, desde displasias severas até carcinomas com invasão extensiva de tecidos adjacentes, bem como em nível esofágico, esplênico, hepático, renal, intestinal e potencializar a desregulação hematológica, bem como reduzir massa corpórea. Porém, a utilização do RSV não interferiu na iniciação e progressão tumoral, apesar de apresentar efeito protetor dos vilos intestinais quando utilizado por pelo menos 10 semanas e atenuar o infiltrado inflamatório e o grau de queratinização nas regiões dos tumores de língua quando utilizado por 20 semanas.

Palavras-chave (DeCS): resveratrol; apoptose; carcinogênese; carcinoma de células escamosas

ABSTRACT

Resveratrol (RSV) is a natural product that has potential in cancer chemoprevention through several molecular targets. The aim of this work was to evaluate the role of RSV in tumor initiation and progression in animal model of oral carcinogenesis induced by 1% 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO). In this sense, 60 Swiss mice were subjected to application of 1% 4NQO on the surface of the tongue five times a week for 20 weeks. The animals were divided into six groups: negative control group (GCN); RSV control group (GCRSV); positive control group (GCP) with 4NQO; and three experimental groups: 4NQO with RSV for 6 weeks (RSV6), 4NQO with RSV for 10 weeks (RSV10) and 4NQO with RSV for 20 weeks (RSV20). RSV was administered at a dose of 8mg/kg/day by gavage. Then, the animals were euthanized after 20 weeks and the tongues were collected for histological analysis. Blood and organ collection was performed for toxicity analysis. For all results, the $p < 0.05$ significance level was considered. Exposure to 4NQO promoted macroscopic changes in the tongue, such as elevations and plaques, and microscopic changes, with the development of microinvasive carcinoma to extensive tissue invasion ($p < 0.001$). Hematological analysis revealed significant leukocytosis in all groups in contact with 4NQO ($p < 0.001$). Regarding systemic toxicity, non-exposure to 4NQO resulted in a significant body mass gain ($p < 0.001$). Microscopic changes were observed in the esophagus, intestine, and liver. When comparing groups, a significant change in the mass of the liver, kidney and spleen was also detected. In conclusion, the present model is capable of developing epithelial changes in the tongue, from severe dysplasias to carcinomas with extensive invasion of adjacent tissues, as well as the esophageal, splenic, hepatic, renal and intestinal levels, potentiating hematological dysregulation and reducing body mass. However, the use of RSV does not interfere with tumor initiation and progression, despite having a protective effect on intestinal villi when used for at least 10 weeks and attenuating the inflammatory infiltrate and the degree of keratinization in the tongue tumor regions when used for 20 weeks.

Keywords (DeCS): resveratrol; apoptosis; carcinogenesis; squamous cell carcinoma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Figura esquemática com arranjo químico do 4NQO	17
Figura 2 -	Estrutura química do trans-Resveratrol	20
Figura 3 -	Variação de massa corpórea de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	34
Figura 4 -	Perfil da contagem absoluta de leucócitos circulantes de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	35
Figura 5 -	Perfil da contagem relativa e absoluta de segmentados circulantes de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	35
Figura 6 -	Perfil da contagem absoluta de linfócitos circulantes de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	36
Figura 7 -	Análise macroscópica de língua de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	37
Figura 8 -	Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de língua de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8 mg/kg/semana em diferentes períodos	40
Figura 9 -	Fotomicrografias da análise adicional da membrana basal do epitélio de língua de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo	

	de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8 mg/kg/semana em diferentes períodos	41
Figura 10 -	Fotomicrografias do esôfago de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	42
Figura 11 -	Fotomicrografias do estômago de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	43
Figura 12 -	Fotomicrografias do intestino de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	44
Figura 13 -	Perfil da massa do baço, normalizada pelo comprimento da tíbia, de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	45
Figura 14 -	Fotomicrografias do baço de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	45
Figura 15 -	Perfil da massa do fígado, normalizada pelo comprimento da tíbia, de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	46
Figura 16 -	Fotomicrografias do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos	47

- Figura 17 - Perfil das massas dos rins direito e esquerdo, normalizada pelo comprimento da tíbia, de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos 47
- Figura 18 - Fotomicrografias do rim de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos 48

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Os critérios de arquitetura e citologia usados para classificação da displasia epitelial, conforme a classificação da OMS 2017..... 28
- Quadro 2 - Tipificação das alterações microscópicas das lesões em língua 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Avaliação microscópica do perfil de displasia pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário na língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos..... 38
- Tabela 2 - Avaliação microscópica, através da classificação adaptada de ANNEROTH (1986), da língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos..... 39
- Tabela 3 - Avaliação microscópica do fígado, rim, esôfago, baço, intestino e estômago de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NQO	4- Nitroquinolina 1- Óxido
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
DMBA	7,12-Dimetilbenz [a] antraceno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etileno-DiaminoTetracético
EPM	Erro Padrão da Média
GCRSV	Grupo Controle Resveratrol
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
HPV	Papiloma vírus humano
IL-6	Interleucina – 6
IV	Intravenosa
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
RSV6	Grupo Teste 1
RSV10	Grupo Teste 2
RSV20	Grupo Teste 3
STATs	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
RSV	Resveratrol
TNF – α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará

UVR Radiação ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
M	Mol
mg	Miligrama
mg/kg	Miligramas por Quilograma
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	JUSTIFICATIVA	23
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVOS	25
5	METODOLOGIA	26
5.1	Animais, princípios éticos e cálculo amostral	26
5.2	Grupos de estudos	26
5.3	Protocolo de carcinogênese oral e de administração do Resveratrol	27
5.4	Análise clínica e microscópica da língua	28
5.5	Análise hematológica	29
5.6	Variação de massa corpórea, pesagem dos órgãos e análise de toxicidade	30
5.7	Comprimento da tibia X Peso dos órgãos	32
5.8	Reação com Ácido Periódico de Schiff (PAS)	32
5.9	Análise estatística	33
6	RESULTADOS	34
6.1	Análise da massa corpórea dos animais	34
6.2	Análise hematológica	34
6.3	Análise macroscópica da língua	36
6.4	Análise microscópica da língua	37
6.5	Análise microscópica do esôfago	42
6.6	Análise microscópica do estômago	42
6.7	Análise microscópica do intestino	43
6.8	Análise microscópica do baço	44
6.9	Análise microscópica do fígado	46
6.10	Análise microscópica do rim	47
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA	64

1 INTRODUÇÃO

Na Oncologia, o avanço tecnológico busca compreender os processos biológicos e, assim, otimizar a eficácia e precisão dos planos de tratamento, elevando as chances de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes. Há uma tendência atual em pesquisar produtos naturais para essa área, o que proporcionou consideráveis inovações com substâncias antineoplásicas, que foram aplicadas para estudos no tratamento de câncer (WANG et al. 2018).

O câncer é uma condição patológica caracterizada pelo crescimento incontrolado e tendência de disseminação de células malignas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Estimou-se 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes mundialmente em 2020 (FERLAY et al. 2021). As modalidades terapêuticas existentes atualmente envolvem cirurgia, radiação, quimioterapia, hormônios e imunoterapia. O câncer pode ser causado, principalmente, por fatores extrínsecos, como tabaco, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos; e por fatores intrínsecos, como mutações genéticas, hormônios, condições imunes e alterações que ocorrem no metabolismo. Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover carcinogênese (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A carcinogênese é o processo de formação de uma neoplasia maligna, sendo dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação abrange as alterações genéticas espontâneas ou induzidas, como exposição a agentes carcinogênicos; isso altera a capacidade de resposta celular ao ambiente e provê uma vantagem proliferativa. A promoção é o período da proliferação celular pré-neoplásica e acumulação, induzindo dano genético adicional e acumulando mutações. A progressão é marcada por expansão neoplásica adicional com aumento da taxa de crescimento tumoral, invasão e metástase (LOPEZ et al. 2021).

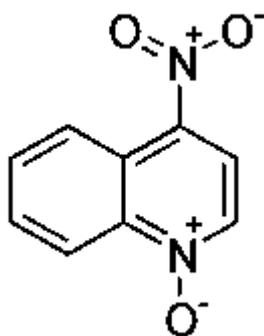
O câncer bucal também está relacionado à ação de agentes físicos e químicos com potencial mutagênico. Dentre eles, o principal fator de risco é o uso de tabaco, seja na forma inalante ou nos hábitos de mascar ou aspirar. Além disso, é relevante considerar as infecções pelo papiloma vírus humano, HPV, a exposição à radiação ultravioleta, UVR, da luz solar e o efeito sinérgico entre o consumo de álcool e o tabaco. Dados nacionais estimam o número de casos novos de câncer da cavidade oral, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, de 15.100 casos, correspondendo ao risco estimado de 6,99 por 100 mil habitantes, sendo 10.900 em homens e 4.200 em

mulheres, ocupando a oitava posição entre os tipos de câncer mais frequentes (INCA, 2022). O impacto econômico do tratamento do câncer oral é alto, sobrecarregando os sistemas de saúde e a economia dos países, principalmente daqueles com grandes populações (ZHANG et al. 2022).

Estudos têm procurado compreender o processo de indução e progressão do câncer de boca em modelos animais. Dentre os diversos modelos experimentais de carcinogênese, o modelo químico de indução parece ser o mais semelhante à realidade clínica. O esquema mais utilizado nos estudos realiza a aplicação do 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) (BARCESSAT et al. 2014).

O 4NQO é uma quinolina que possui uma estrutura aromática heterocíclica (Figura 1) de fórmula C_9H_7N e pode ser encontrada naturalmente no ambiente, mas é tipicamente fabricado para fins de pesquisa. O 4NQO imita os efeitos biológicos da luz ultravioleta e dos carcinógenos oriundos do fumo de cigarro em vários organismos. Essa substância se liga covalentemente às macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, causando dano ao material genético, através da produção de espécies reativas de oxigênio, ROS (KANOJIA et al. 2006).

Figura 1:Figura esquemática com arranjo químico do 4NQO.



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 12/12/2023.

Dessa forma, obtém-se uma evolução clínica e histopatológica extremamente próxima às fases observadas nos carcinomas de células escamosas em humanos, desde a fase de carcinoma *in situ* até o estágio bem diferenciado, seguindo a gradação histopatológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) para esse tumor (BARCESSAT et al. 2014).

O modelo de indução com o 4NQO costuma ser realizado com a administração da solução diluída em água ou através da fricção da solução na região de interesse. Acredita-se que a administração através da fricção possa causar menos efeitos

sistêmicos tóxicos indesejados, visto que a quantidade ingerida é menor, embora alterações hepáticas, renais e esplênicas já tenham sido detectadas (BARCESSAT et al. 2014).

Durante o processo de carcinogênese epitelial, diversos mecanismos intracelulares já foram descritos. É de fundamental relevância que se conheçam as alterações moleculares envolvidas no surgimento e progressão das lesões malignas para eleição de alvos terapêuticos ou sinalizadores de progressão.

Dentre os mais importantes para o metabolismo e crescimento celular, que resultam em fenótipo maligno, está a via de sinalização PI3K/PKB/mTOR. Através de meios inibidores desse sistema, há diminuição da inflamação (*COX2 downregulation*), angiogênese (*VEGF downregulation*), parada do ciclo celular (interrupção das fases S e G2/M) e estímulo à apoptose das células tumorais (KUMARI et al. 2024).

Outro mecanismo relevante no contexto da iniciação da resposta imune, inflamação e progressão do câncer é a via de sinalização NF- κ B. Esse complexo protéico controla a expressão de genes alvo como Bcl2, TNFA, VEGF, Bclxl, IL-6, que medeiam a proliferação e angiogênese de células tumorais. Assim, o aumento dos níveis de NF- κ B, alavanca os de IL-6, que é uma proteína pró-inflamatória e pró-angiogênica, ativando mediadores da resposta imune inata e adquirida que podem contribuir para a progressão tumoral (KUMARI et al. 2024; HOUGHTON et al. 2005; SHINRIKI et al. 2009).

A via de sinalização Wnt também tem papel em vários tipos de mecanismos de proliferação de células tumorais, sobrevivência celular, polaridade e migração. No que concerne ao câncer oral, é observado que a desregulação dessa via é associada ao prognóstico dos pacientes, sugerindo que o aumento dos níveis de proteínas Wnt em tecidos tumorais induzem a carcinogênese oral, através da invasão e migração das células cancerígenas. Dessa forma, o mecanismo de sinalização Wnt pode ser utilizado como um biomarcador para detecção de câncer de boca (KUMARI et al. 2024).

Ademais, a via de sinalização Notch também tem um mecanismo que interfere em vários cânceres de modo distinto. Por exemplo, é altamente ativo em câncer de mama e linfomas de células T, já em tumores de pele e boca a expressão dessa via é suprimida. A sinalização anômala da via Notch influencia na carcinogênese através de alterações no ritmo de proliferação celular, na atividade de células-tronco e do microambiente tumoral, visto que há relação entre a hipóxia e a expressão de genes alvo Notch. Além disso, os componentes da via de sinalização Notch interage com moléculas

de outros mecanismos de sinalização, impactando o crescimento tumoral de variadas maneiras e vice-versa (KUMARI et al. 2024).

A via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) tem múltiplos componentes com submecanismos que modulam diferentes fatores que afetam os processos celulares, como promoção de proliferação celular, inibição de apoptose, promoção de angiogênese tumoral, indução de invasão e metástase no câncer oral. Foi observada que essa transição da área epitelial para o interior do mesênquima é promovida pelo TNF- α , que tem sua expressão aumentada pelos componentes da via MAPK (KUMARI et al. 2024).

Outra via de sinalização relevante para o entendimento da carcinogênese oral é a Hedgehog. Esse mecanismo envolve uma grande gama de processos biológicos, incluindo o início da divisão e crescimento celular, especificação de linhagem e tarefas relacionadas à sobrevivência. Nesse sentido, quando há expressão aberrante dessa via, há impacto importante na carcinogênese, reduzindo a sobrevida geral dos pacientes com a doença câncer (KUMARI et al. 2024).

Por fim, outra via de sinalização essencial no estudo dos tumores de cabeça e pescoço é a via de sinalização HIPPO. Essa proteína quinase é essencial no desenvolvimento dos tumores, controle da homeostase das células-tronco, regeneração tecidual e regulação do tamanho dos órgãos. De maneira resumida, as vias de sinalização mencionadas acima interferem através de diferentes mecanismos no desenvolvimento e progressão do câncer oral. Dessa forma, poderiam ser utilizados como alvos terapêuticos no manejo da doença (KUMARI et al. 2024).

Sabe-se que aproximadamente 80% dos tumores de cabeça e pescoço exibem *upregulation* da expressão de STAT3, a qual pode mediar radiorresistência e quimiorresistência. A hiperativação dessa proteína também pode ser sinalizada como um interessante parâmetro a ser estudado em cânceres de cabeça e pescoço (LEONG et al. 2003).

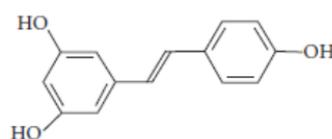
Os STATs (*SignalTransducerandActivatorofTranscription*) são proteínas pertencentes à família de transdutores de sinais e ativadores de transcrição que atuam tanto de forma fisiológica, quanto na proliferação celular, transformação, metástase e angiogênese, podendo ser ativadas por citocinas como IL-6 ou fatores de crescimento (GELETU et al. 2013; LEVY, 1999). Essa proteína tem relação com a fase aguda da inflamação e é um fator de transcrição residente no citoplasma de forma latente (AKIRA et al. 1994).

A participação de STAT3 foi evidenciada em estágios precoces de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (NAGPAL, MISHRA & DAS, 2002). Estudos mostram que há uma provável associação entre a expressão aumentada de IL-6, ativando a via STAT3, o que contribui para a progressão tumoral em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (JOHNSTON et al. 2015). Já é bem documentado que processos inflamatórios podem promover e/ou exacerbar a carcinogênese. As citocinas, como a IL-6, são componentes importantes produzidas pelas células cancerígenas. Dessa forma, uma via promissora é a modulação da expressão e do sinal de IL-6, visto que seus altos níveis estão correlacionados com prognósticos clínicos ruins (SHINRIKI et al. 2009).

Em estudo realizado com linhagem de células FaDu de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, concluiu-se que o composto denominado Resveratrol (RSV) suprime a STAT3 constitutiva e sua ativação. Além disso, também leva à diminuição da expressão de produtos de genes regulados por STAT3, além de induzir efeitos apoptóticos das células cancerígenas, mostrando-se como um interessante composto para estudos antitumorais (BAEK et al. 2016).

O Resveratrol (trans-3,5,4' trihidroxistilbene) é uma fitoalexina, um polifenol natural que tem papel importante em diversas atividades biológicas, podendo ser encontrado em muitas variedades de uvas vermelhas, ruibarbo e amendoim. Ele possui ação anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, antineurodegenerativa e propriedades estrogênicas (MALAGUARNERA, 2019). Existem duas estruturas de resveratrol: cis-Resveratrol e trans-Resveratrol, sendo a trans-Resveratrol (Figura 3) a forma mais referida na literatura (WANG et al. 2017), pois é a mais estável, mais biodisponível em modelos animais e a que exerce funções fisiológicas *in vivo* (LAMUELA-RAVENTOS et al. 1995).

Figura 2: Estrutura química do trans-Resveratrol



Fonte: SAUTTER et al. 2005.

Estudos prévios têm mostrado que o RSV exerce seus efeitos antitumorais via mecanismos pleiotrópicos, conjunto de múltiplos efeitos em um gene, em vez de um

único mecanismo de ação (REN et al. 2021). Nos últimos anos, esse composto tem se destacado por sua atividade antitumoral, com capacidade para proteger células normais da radiação, dano quimioterápico e por se mostrar um coadjuvante na supressão de células tumorais. Os mecanismos de ação não estão completamente esclarecidos, porém a literatura apresenta evidências de um papel-chave na sinalização apoptótica de células tumorais, através da estimulação direta da cascata de caspases e pela inibição dos mecanismos antiapoptóticos, que contribuem para a imortalidade das células tumorais (LI et al. 2013; XU et al. 2017).

Além disso, a atividade antiproliferativa do RSV também ocorre através do aumento da atividade da p53. O p53 é um gene supressor de tumor bem conhecido que induz apoptose e bloqueia a fase de replicação do DNA, mediado pela parada do ciclo celular. A p53 age ligando-se às sequências específicas de DNA e induzindo *upregulation* da expressão de genes pró-apoptóticos e *downregulation* dos inibidores dos genes anti-apoptóticos (SINGH et al. 2017).

Além disso, de um modo dose-dependente, o RSV inibe proteínas relacionadas à proliferação celular, como o Ki67. O Ki67 pode ser detectado apenas durante as fases de crescimento e síntese, mas não durante a fase de repouso do ciclo celular, G0. O tratamento utilizando RSV inibe a expressão desse marcador em estudo com linhagem de células tumorais, dessa forma apresentando efeito sobre a supressão da proliferação celular (XIONG et al. 2019).

Ademais, é encontrada uma alta concentração de ROS nas células cancerígenas. Esses compostos funcionam como um pilar na iniciação e progressão da doença, através da promoção do crescimento celular e imortalização. O RSV carrega propriedades antioxidantes, modulando enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BERRETTA, 2020). O estresse oxidativo, particularmente quando desencadeado por superóxido, tem capacidade de quelar óxido nítrico (NO), através da formação de radicais de peroxinitrito altamente reativos. Essa reação pode contribuir para a disfunção endotelial (PRYOR & SQUADRITO, 1995). O peroxinitrito é considerado a principal fonte de dano oxidativo aos aminoácidos. Esse fato compromete a função proteica e inativa enzimas. O peroxinitrito pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de modificar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina (BARREIROS et al. 2006). Nesse sentido, estudos apontaram que níveis elevados de nitrotirosina foram normalizados pelo

tratamento com o RSV (BHATT et al. 2011), sendo esse um marcador relevante a ser considerado na carcinogênese oral.

Nesse sentido, o RSV age como um quimiopreventivo nos quatro principais estágios da carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e metástase; e tem mostrado eficácia no tratamento oncológico em estudos *in vitro* e *in vivo* (REN et al. 2021).

Em estudo com carcinogênese oral induzida por 7,12-Dimetilbenz [a] antraceno (DMBA) em *hamsters* utilizou-se a aplicação tópica de RSV em mucosa jugal e observou-se efeito quimiopreventivo em termos de prevalência de lesões, multiplicação, dimensão e sinais histológicos de malignidade (BERTA et al. 2010).

Em outro modelo utilizando o 4NQO como indutor de carcinogênese, o RSV foi utilizado na dieta dos animais na concentração de 0,25% (p/p) e foi detectada redução significativa da incidência de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, bem como a prevenção da multiplicação e severidade das mesmas (SHROTRIYA et al. 2015).

Nesse contexto, o RSV apresenta interessante potencial quimiopreventivo e de limitação da progressão de tumores de cabeça e pescoço. Portanto, foi objetivo do presente estudo avaliar o papel do RSV em modelo animal de carcinogênese oral induzida por 4NQO na iniciação até a progressão tumoral.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é um problema de saúde pública que a cada ano cresce em todas as regiões do mundo. Atualmente, as modalidades para tratamento do câncer consistem em quimioterapia, radioterapia e cirurgias que são, na grande maioria dos casos, mutiladoras e impactam a qualidade de vida do paciente de forma permanente. A busca por métodos alternativos, que sejam efetivos e que apresentem menos efeitos adversos é a utilização de compostos naturais com potenciais terapêuticos. Nesse sentido, o RSV tem apresentado resultados satisfatórios em estudos animais e celulares, com diminuição do crescimento tumoral e atividade quimiopreventiva relevante.

A compreensão do papel do RSV na iniciação, progressão e desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral, por meio de modelo experimental utilizando um dos principais carcinógenos do cigarro, principal associado ao desenvolvimento do câncer de boca, servirá como apoio no entendimento da interação entre esse composto natural e o desenvolvimento de tumor em língua. Há escassez de estudos na literatura que correlacionem o uso do RSV e suas repercussões no câncer oral.

Do ponto de vista translacional, o RSV demonstra promissora eficácia na quimioprevenção de diferentes tumores, incluindo os de cabeça e pescoço, através de efeitos pleiotrópicos em diferentes vias de sinalização, com toxicidade seletiva para células cancerígenas. Quando utilizado em combinação com outros agentes terapêuticos, pode ajudar a superar limitações como resistência à medicação e toxicidade. Entretanto, são necessários estudos pré-clínicos, para constatação de que o RSV pode ser benéfico para pacientes com câncer durante estudos clínicos.

Dessa forma, além de ser bastante útil no entendimento do processo de carcinogênese, o presente estudo fornece subsídios para o desenvolvimento de estudos experimentais e medicamentos teste com potencial de adicionar aos protocolos terapêuticos convencionais um agente natural com menor efeito adverso no organismo humano.

3 HIPÓTESE

3.1 Hipótese Nula

O tratamento com Resveratrol não influencia na iniciação promoção ou progressão da carcinogênese oral induzida por 4NQO em camundongos.

3.2 Hipótese Alternativa

O tratamento com Resveratrol influencia na iniciação, promoção ou progressão da carcinogênese oral induzida por 4NQO em camundongos.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do Resveratrol na carcinogênese oral induzida por 4NQO em camundongos.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar as alterações macroscópicas e microscópicas da língua de camundongos submetidos à modelo de carcinogênese por 4NQO e tratados com RSV durante iniciação, progressão tumoral e após estabelecimento do tumor;

Avaliar a influência do tratamento com RSV em alterações hematológicas e variação de massa corpórea de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO;

Avaliar a influência do tratamento com RSV na toxicidade órgão específica e no sistema digestório de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese por 4NQO.

5 METODOLOGIA

5.1. Animais, princípios éticos e cálculo amostral

O presente estudo foi submetido à Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará estando de acordo com a Lei Federal nº 11,794 (2008) e o decreto número 6,689 (2009) que regulamentam a experimentação animal no país (www.planalto.gov.br/ccivil03/Atos200720102008/LeiL11794.htm), sendo registrado com o protocolo 01090122-0 (Anexo A).

Fundamentado no princípio dos 3R (*reduction, replacement and refinement*) que norteiam as condutas éticas em animais e baseado no modelo de carcinogênese orofaríngea com 4NQO de TANG et al. que em 2004 observou que animais tratados com solução 100µg/ml apresentaram maior frequência de tumores que animais tratados com uma subdose de 20µg/ml (100% versus 33%), estimou-se necessário 10 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança o presente modelo (Método de Fleiss com correção de continuidade) (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSCC.htm>).

Um total de 60 camundongos *Swiss (Mus musculus)* machos entre 6 e 8 semanas foram acondicionados no biotério de experimentação do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da referida Universidade em temperatura média de 24° C com ciclos de 12 horas de luz-escuro e acesso irrestrito a água e a alimento. Os animais foram aleatoriamente (Microsoft Excel) alocados em seis grupos de estudo conforme protocolo abaixo citado. Esse número foi determinado após cálculo amostral baseado no trabalho de TANG et al. (2004).

5.2. Grupos de estudo

O estudo contou com seis grupos, cada um com 10 camundongos distribuídos aleatoriamente em:

Grupo Controle Negativo (GCN): O GCN foi submetido ao modelo de carcinogênese oral utilizando apenas o veículo do 4NQO, o DMSO a 4%;

Grupo Controle Resveratrol (GCRSV): O GCRSV foi submetido ao tratamento com RSV durante todo o protocolo experimental;

Grupo Controle Positivo (GCP): O GCP foi submetido ao modelo de

carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO a 4%;

Grupo Teste 1 (RSV6): O grupo RSV6 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO a 4%, tendo início do tratamento com RSV nas últimas 6 semanas do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência após o estabelecimento das lesões;

Grupo Teste 2 (RSV10): O grupo RSV10 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO a 4%, tendo início do tratamento com RSV nas últimas 10 semanas do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência na progressão das lesões;

Grupo Teste 3 (RSV20): O grupo RSV20 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4NQO a 1% diluído em propilenoglicol e DMSO a 4%, tendo início do tratamento com RSV desde o início do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência na iniciação das lesões.

5.3. Protocolo de carcinogênese oral e de administração do Resveratrol

A aplicação da solução com 1% de 4NQO (GANNOT et al. 2004) diluído em propilenoglicol e DMSO a 4% (KAPLAN et al. 2002) ocorreu cinco vezes por semana (segunda a sexta) durante 20 semanas, adaptados de protocolos previamente descritos (BARCESSAT et al. 2014). Os camundongos foram imobilizados a fim de obter a cavidade bucal aberta, e assim, realizar a administração do 4NQO por meio de *microbrushes*, que foram pincelados levemente em língua durante 10 segundos por todo o dorso de língua. O processo foi repetido a fim de garantir o contato adequado do carcinógeno com os tecidos linguais.

Devido à baixa solubilidade em água, o trans-resveratrol na posologia de 8mg/kg foi incorporado em 1% (p/v) de carboximetilcelulose em água e administrado por via oral, por gavagem. A preparação e administração do composto foram realizadas em luz baixa para evitar a isomerização para a sua forma cis (SENGOTTUVELAN & NALINE, 2006). A administração ocorreu diariamente (segunda a sexta), a partir do início do protocolo de cada grupo experimental (RSV6, RSV10 e RSV20) até o dia da

eutanásia. Os camundongos foram eutanasiados com sobredose de xilazina (30mg/kg) e quetamina (240mg/kg) após 20 semanas para coleta de amostras biológicas.

5.4. Análise clínica e microscópica da língua

Foi realizada visualização direta da língua a fim de verificar possíveis alterações teciduais, como áreas avermelhadas, placas ou elevações induzidas pelo 4NQO. Posteriormente, as línguas e tecidos adjacentes foram excisados e fixados em formol 10% tamponado para avaliação macroscópica. As línguas foram hemisseccionadas longitudinalmente e os fragmentos acomodados em cassetes histológicos para processamento através da desidratação (solução crescente de álcool) e diafanização (xilol) em processador automático (Lupetec®). Posteriormente, os fragmentos foram emblocados em parafina fundida a 58-60°C e submetidos a cortes de 3µm, dispostos em lâminas de vidro com ponta fosca, as quais foram desparafinizadas em estufa (60°C) por uma hora, imersas em banhos de xilol, reidratadas (solução alcoólica decrescente), coradas com hematoxilina-eosina, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellan®.

A partir daí, todas as lesões foram submetidas a diferentes métodos de avaliação histológica com o intuito de obter uma maior sensibilidade na avaliação. Posteriormente, foi realizado um desfecho microscópico dos achados do epitélio de língua. A análise das lesões foi realizada através da classificação da Organização Mundial da Saúde, 2017, que verifica a presença de mudanças arquiteturais e citológicas no epitélio de língua (Quadro 1). Logo após, foi realizado o somatório das alterações histopatológicas, através da média encontrada dentro de cada grupo experimental.

Quadro 1: Os critérios de arquitetura e citologia usados para classificação da displasia epitelial, conforme a classificação da OMS 2017.

Alterações Arquiteturais	Alterações Celulares
Estratificação Epitelial Irregular	Anisonucleose
Perda de Polaridade das Células Basais	Pleomorfismo Nuclear
Cristas em forma de gota	Anisocitose
Aumento do número de figuras mitóticas	Razão citoplasmática nuclear aumentada

Figuras mitóticas anormalmente superficiais	Aumento do tamanho nuclear
Disceratose	Figuras mitóticas atípicas
Pérolas de Queratina	Aumento no número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromasia

Fonte: MÜLLER (2017).

Adicionalmente, todos os tecidos das línguas foram avaliados através da classificação adaptada por Anneroth; Hansen; Silverman, (1986) com o intuito de mensurar a intensidade dos achados histopatológicos nos grupos.

Quadro 2: Tipificação das alterações microscópicas das lesões em língua.

Alteração microscópica	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Queratinização	Ausência de alteração	> 50%	20 a 50%	<20% + Disceratose
Pleomorfismo nuclear	Ausência de alteração	=25%	50%	>50%
Estágio de invasão	Ausência de alteração	Displasia severa	Microinvasão da lâmina própria	Invasão extensiva de tecidos adjacentes
Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário	Ausência de alteração	Leve	Moderada	Intenso

Fonte: Adaptado de ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN (1986).

5.5 Análise hematológica

Foram coletados 2mL de sangue através de punção da veia caudal para análise hematológica e imediatamente armazenado em *ependorfs*, contendo 0,2mL de solução 1% de ácido etileno-dimanino tetra-acético (EDTA) dissolvido em solução salina estéril 0,9%. Uma gota de sangue foi disposta sobre uma lâmina de vidro para coloração por panótico rápido e análise hematológica. Posteriormente, uma sobredose de xilazina (30mg/kg) e quetamina (240mg/kg) foi administrada para eutanásia.

A leitura se deu em movimento de zigue-zague transversal ao tamanho da lâmina em direção da parte mais espessa para a parte menos espessa. Foram contados os números de cada um dos elementos sanguíneos celulares (neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos) até um total de 100 células, obtendo-se, assim, a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos. Para contagem total de leucócitos foi manipulado individualmente de cada animal, 20µl de sangue juntamente com 380µl da solução de Turk, colocados em *eppendorfs* e submetidos ao vórtex. Posteriormente, o resultante foi colocado em uma câmara de Neubauer e contabilizados os leucócitos totais presentes nos quadrantes das extremidades da câmara (GOES et al. 2014).

5.6 Variação de massa corpórea, pesagem dos órgãos e análise de toxicidade

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da variação de massa corpórea e, após eutanásia, foram retirados esôfago, estômago, intestino delgado, fígado, baço e rins para análise de toxicidade. Os tecidos do trato gastrointestinal foram excisados, lavados com solução salina estéril, utilizando seringa hipodérmica sem agulha e fixados em formol 10% tamponado. Rins, baço e fígado também foram retirados cirurgicamente, pesados em balança de 10⁻⁵g de precisão e fixados, igualmente, em formol 10% neutro. Todas as amostras foram submetidas à análise macroscópica.

O esôfago e o intestino delgado foram seccionados transversalmente e o estômago aberto e lavado em água corrente. Do fígado foi seguido um fragmento transversal do maior lobo hepático, contendo 3mm de espessura. Os rins e baço foram hemisseccionados longitudinalmente para inclusão. Após processamento histológico em processador automático de tecidos (Lupetec®), as amostras foram embebidas em parafina, seccionadas com 3µm de espessura, e os cortes foram dispostos em lâminas convencionais para coloração por hematoxilina-eosina (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017).

Para análise histopatológica em microscópio ótico, um patologista oral descreveu os achados histológicos com base na presença ou ausência das alterações específicas de cada órgão, descritos a seguir (SILVA et al. 2016):

5.6.1 Esôfago

As lâminas referentes ao esôfago foram analisadas por meio de presença e/ou ausência, para cada um dos parâmetros (GREAVES, 2007): integridade do epitélio de revestimento, vasos ectásicos, foco inflamatório em submucosa, tampões de ceratina, bem como pleomorfismo basal, mitose e células apoptóticas.

5.6.2 Estômago

Para analisar a toxicidade no estômago, foram consideradas as alterações presentes na região fúndica.

Foram considerados para análise: integridade do revestimento de mucosa, presença/rarefação de células parietais e principais, congestão vascular e/ou hemorragia na submucosa e mucosa, além da presença de células inflamatórias (GREAVES, 2007).

5.6.3 Intestino delgado

Para análise de toxicidade no intestino delgado, o achatamento dos vilos, perda das criptas, inflamação aguda e crônica na mucosa e/ou submucosa, vacuolização e preservação do tecido muscular foram os parâmetros considerados (GREAVES, 2007).

5.6.4 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações (adaptado de VASCONCELLOS et al. 2007; adaptado de BARBIERI et al. 2010): infiltração de células inflamatórias; tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos, hiperplasia de células de Kupffer, hemorragia sinusoidal, necrose focal de hepatócitos e esteatose micro e macro vesicular em hepatócitos (>5%).

5.6.5 Rim

Já para as lâminas referentes ao tecido renal, a tumefação do epitélio tubular, presença de células inflamatórias perivascular e intersticiais, cilindro-hialino, hemorragia glomerular e intersticial foram utilizados para a avaliação de toxicidade (adaptado de VASCONCELLOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010)

5.6.6 Baço

Para análise de toxicidade do baço foram analisadas de forma qualitativa a manutenção da proporcionalidade entre polpa branca e vermelha e presença de hemorragia (GREAVES, 2007).

5.7 Comprimento da tíbia X Peso dos órgãos

A remoção da tíbia direita de cada animal de todos os grupos foi realizada no dia da eutanásia e medida através de um paquímetro.

O peso corporal pode ser diretamente afetado ou funcionar como fator de confusão por alguns tipos de comorbidades, como a caquexia. Além disso, algumas modalidades de tratamentos podem induzir alterações na composição corporal. Nesses casos, a indexação do tamanho dos órgãos pelo peso corporal pode induzir erros significantes nos valores de normalização e na comparação entre os grupos. Para evitar tais equívocos, a medida do comprimento da tíbia é recomendada e amplamente usada como fator de normalização dos pesos dos órgãos coletados em modelos animais (HAGDORN et al. 2019).

5.8 Reação com Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A membrana basal pode ser identificada através de vários marcadores histoquímicos, como a reação da coloração histoquímica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) (KIERSZEMBAUM, 2004).

As lâminas foram desparafinizadas em xilol, posteriormente hidratadas em sequência alcoólica decrescente (99%, 95%, 70%) e lavadas em água corrente. Em seguida, na seção dos tecidos, foi gotejado, de acordo com as recomendações do fabricante, o Ácido Periódico, reagente de Schiff e Hematoxilina de Harris respectivamente, lavadas em água corrente, secas, desidratadas em série de álcool ascendente até o xilol e montagem das lâminas.

Essa análise é útil na identificação de características de tumores e no conhecimento do seu comportamento invasivo. Foi analisado o padrão de coloração histoquímica à microscopia de luz, sendo realizada por dois examinadores.

5.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos em forma de média \pm EPM, analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados utilizando o teste ANOVA-1-way e ANOVA-2-way seguido do pós-teste de Bonfferoni (dados paramétricos). Os escores histológicos foram expressos como mediana (máxima e mínima) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

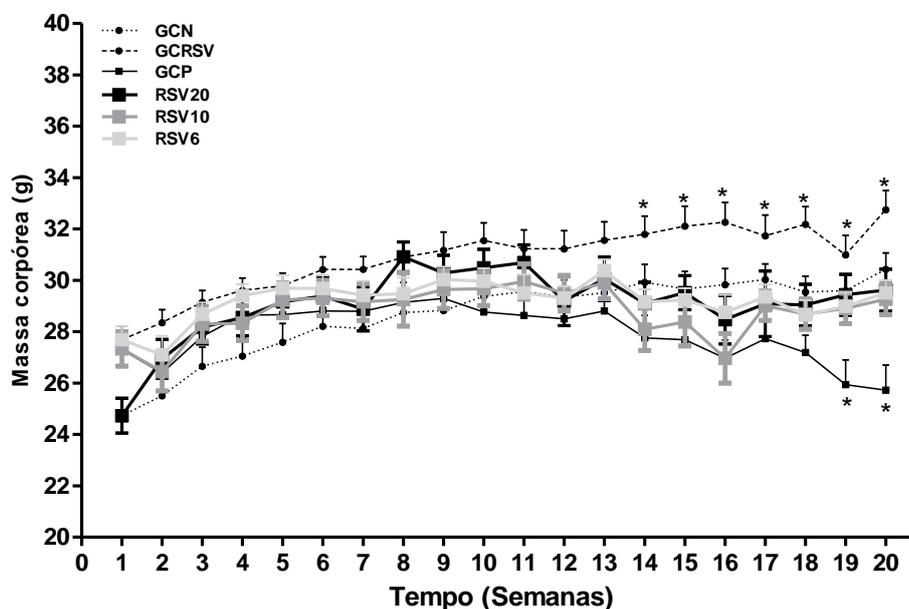
Em todas as análises estatísticas considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$), sendo todas as análises realizadas no programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da massa corpórea dos animais

Durante o experimento, todos os animais apresentaram ganho de peso até a semana 13, independente do grupo analisado. Foi observada redução do peso a partir da semana 14 até o fim do experimento (semana 20) em todos os grupos, com exceção do GCRSV. Na comparação entre os grupos, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) da 14ª a 20ª semana entre todos os grupos teste e controles e o GCRSV. A partir da 19ª semana o grupo controle positivo apresentou a maior perda de peso, comparado aos demais grupos (Figura 3).

Figura 3: Variação de massa corpórea de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



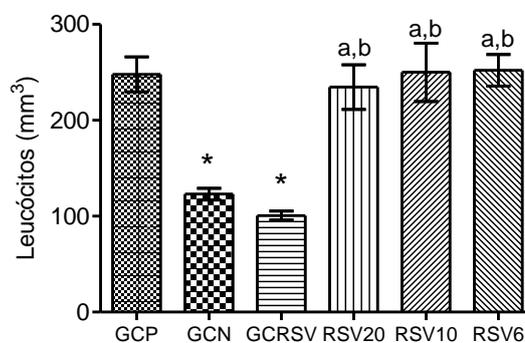
GCN = grupo controle negativo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCP = grupo controle positivo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; * $p < 0,05$ em relação aos grupos durante 20 semanas de experimento.

6.2 Análise Hematológica

Os grupos que entraram em contato com o carcinógeno (GCP, RSV20, RSV10 e RSV6) apresentaram uma média absoluta de leucócitos circulantes significativamente maior ao final do experimento, em comparação ao grupo controle

negativo ($123,00 \pm 6,20$ cél/mm³) e o grupo controle Resveratrol ($100,70 \pm 4,56$ cél/mm³) ($p < 0,05$) (Figura 4).

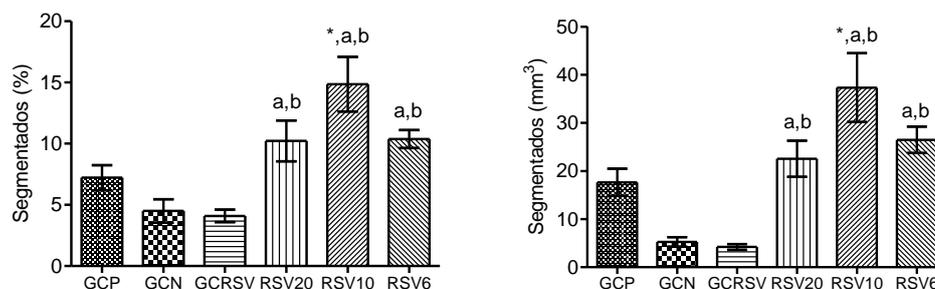
Figura 4: Perfil da contagem absoluta de leucócitos circulantes de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCP = grupo controle positivo; GCN = grupo controle negativo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas. * $p < 0,05$ vs. GCP; ^a $p < 0,05$ vs. GCN; ^b $p < 0,05$ vs. GCRSV; os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média, sendo analisados por One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Na contagem relativa e absoluta (Figura 5) de segmentados circulantes, os gráficos apresentaram resultados semelhantes. Os grupos teste RSV6 e RSV20, que correspondem aos animais que receberam o Resveratrol durante 6 e 20 semanas respectivamente, apresentaram médias ($10,22 \pm 1,67$ e $10,38 \pm 0,73$) significativamente maiores em comparação ao grupo controle negativo e ao grupo controle Resveratrol. O grupo teste RSV10, que corresponde aos animais submetidos à aplicação de 4NQO em conjunto ao tratamento com Resveratrol por 10 semanas, apresentou uma média ($14,86 \pm 2,23$) significativamente maior ao final do experimento em comparação aos três grupos controle analisados (GCP, GCN e GCRSV) ($p < 0,001$).

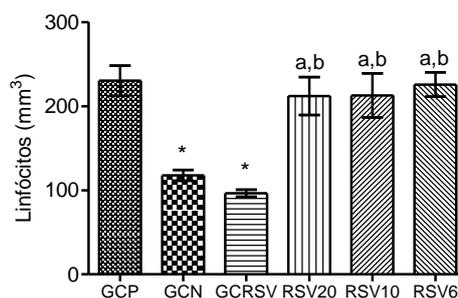
Figura 5: Perfil da contagem relativa e absoluta de segmentados circulantes de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCP = grupo controle positivo; GCN = grupo controle negativo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas. * $p < 0,05$ vs. GCP; ^a $p < 0,05$ vs. GCN; ^b $p < 0,05$ vs. GCRSV; os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média, sendo analisados por One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Por fim, a contagem absoluta de linfócitos circulantes (Figura 6), demonstrou que os três grupos teste (RSV20, RSV10 e RSV6) apresentaram médias ($212,00 \pm 22,54$; $212,70 \pm 26,29$; $225,70 \pm 14,45$) significativamente maiores que os grupos controle (GCN e GCRSV). Além disso, o GCN e GCRSV apresentaram médias ($117,70 \pm 6,49$; $96,49 \pm 4,24$) menores que o grupo controle positivo.

Figura 6: Perfil da contagem absoluta de linfócitos circulantes de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



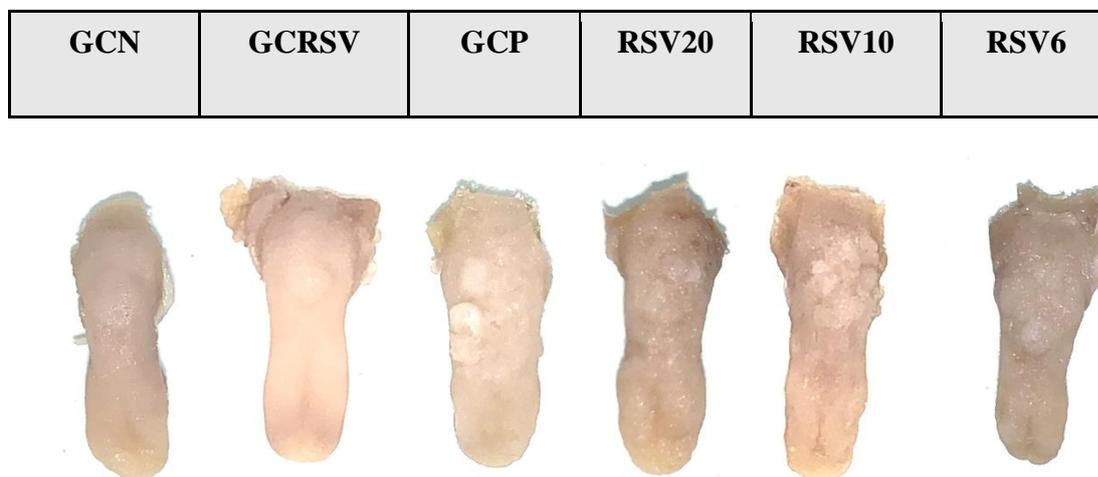
GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas. * $p < 0,05$ vs. GCP; ^a $p < 0,05$ vs. GCN; ^b $p < 0,05$ vs. GCRSV; os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média, sendo analisados por One-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

6.3 Análise Macroscópica da Língua

Após a fixação em formol, as características macroscópicas das línguas foram analisadas. A visualização direta da língua foi realizada a fim de verificar possíveis alterações teciduais induzidas pelo 4NQO. Alterações macroscópicas foram

mais concentradas no terço médio e posterior, descritas como elevações e placas em dorso de língua dos animais analisados do GCP, assim como em todos os grupos teste (RSV20, RSV10 e RSV6), através da visualização direta (Figura 7).

Figura 7: Análise macroscópica de língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCN = grupo controle negativo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCP = grupo controle positivo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4 Análise Microscópica da Língua

A análise microscópica das línguas do grupo controle RSV não apresentou alterações arquiteturais ou celulares. Os espécimes demonstraram a presença de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado em língua, com regiões de projeções da queratina semelhantes a “dente em serra” em toda a superfície, sendo mais proeminentes em região posterior, que também abrigava um maior número de glândulas salivares e botões gustativos. Subjacente observou-se a presença de vasos sanguíneos com tecido muscular esquelético intacto.

As alterações arquiteturais e celulares presentes nos demais grupos foram detectadas, incluindo, estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, cristas em forma de gota, aumento do número de figuras mitóticas, disceratose, variação anormal na anisocitose e no pleomorfismo celular, razão citoplasma/núcleo aumentada, aumento do tamanho nuclear e figuras mitóticas atípicas. Essas alterações

foram significativamente maiores no GCP e nos grupos teste submetidos ao 4NQO e tratados com o Resveratrol por 6 (seis), 10 (dez) e 20 (vinte) semanas, quando comparados aos GCN e GCRSV ($p < 0,001$). O pleomorfismo nuclear e celular, a presença de figuras mitóticas típicas e atípicas e a hiperchromasia foram achados ocasionais em alguns animais do GCN, porém apenas a hiperchromasia apresentou-se como alteração estatisticamente significativa em comparação ao GCRSV. Já nos GCP, RSV20, RSV10 e RSV6, todos os parâmetros de alterações citológicas mencionados acima apresentaram diferença significativa, quando comparados ao GCRSV ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação microscópica do perfil de displasia pelo método da Organização Mundial de Saúde, associado ao método binário na língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.

	GCN	GCRSV	4NQO				p-Valor
			GCP	RSV6	RSV10	RSV20	
Alterações arquiteturais							
Estratificação Epitelial Irregular	30%	0%	100%*†	100%*†	100%*†	100%*†	<0,001
Perda de Polaridade das células basais	20%	0%	100%*†	100%*†	100%*†	100%*†	<0,001
Cristas em forma de gota	0%	0%	100%*†	100%*†	100%*†	100%*†	<0,001
Aumento do nº de figuras mitóticas	0%	0%	100%*†	100%*†	100%*†	100%*†	<0,001
Figuras mitóticas anormalmente superficiais	0%	0%	30%	20%	20%	20%	0,318
Disceratose	0%	0%	100%*†	100%*†	100%*†	100%*†	<0,001
Pérolas de queratina	0%	0%	30%	30%	20%	20%	0,242
Alterações citológicas							
Pleomorfismo nuclear	20%	0%	100%*†	100%*†	90%*†	100%*†	<0,001
Pleomorfismo celular	20%	0%	100%*†	100%*†	90%*†	100%*†	<0,001
Figuras mitóticas típicas e atípicas	20%	0%	100%*†	100%*†	90%*†	100%*†	<0,001
Hiperchromasia	90%	0%*	100%†	100%†	90%†	100%†	<0,001

GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; * $p < 0,05$ vs. GCN; † $p < 0,05$ GCRSV, teste qui-quadrado ou exato de Fisher (%) (n=10/grupo).

Na análise do epitélio lingual, segundo a classificação adaptada de ANNEROTH (1986), no tangente à queratinização, revelou-se que os GCN (100%) e GCRSV (90%) apontaram o escore 0 (ausência de alteração), o que representou uma diferença significativa, quando comparado ao GCP (0%) e grupos teste de 6 (0%), 10 (0%) e 20

(20%) semanas. O grupo teste de 20 semanas apresentou 50% dos animais com o escore 2 (20 a 50% de queratinização) ($p < 0,001$). Já o GCP (100%) e os grupos teste submetidos ao 4NQO e tratados com RSV por 6 (100%) e 10 (77,8%) semanas, apresentaram, de forma significativa, o maior escore: 3 (<20% e disceratose) ($p < 0,001$) (Tabela 2).

O GCP (100%) e os grupos teste de 6 (100%) e 10 (66,7%) semanas apresentaram o maior escore, 3 (>50%), para pleomorfismo celular ($p < 0,001$). Já o grupo teste de 20 semanas exibiu prevalência de escore 2 em 30% dos animais (50%) e de escore 1 em 30% (=25%) ($p < 0,001$). Por fim, o GCN apresentou 80% dos animais com escore 0, enquanto o GCRSV mostrou 100% dos animais com ausência de alteração no pleomorfismo celular (escore 0) ($p < 0,001$) (Tabela 2). Dessa forma, observou-se redução do grau de pleomorfismo com 20 semanas de uso do Resveratrol.

No tocante à invasão, o GCP apresentou 90% dos animais com estágio 2 de invasão (microinvasão da lâmina própria) e 10% com estágio 3 (invasão extensiva de tecidos adjacentes). Semelhantemente, o grupo RSV6 desenvolveu estágio 2 de invasão em 90% dos animais, enquanto 10% apresentaram estágio 1 (displasia severa). O grupo RSV10 apresentou a maioria dos animais em estágio 2 de invasão (88,9%). Enquanto 11,1% dos animais foram classificados com estágio 1. Já o grupo RSV20 exibiu a maioria dos animais em estágio 2 (60%), enquanto 30% dos camundongos com estágio 1 e 10% em estágio 3 de invasão. Já os GCN (100%) e GCRSV (100%) não apresentaram alteração ($p < 0,001$) (Tabela 2) (Figura 8).

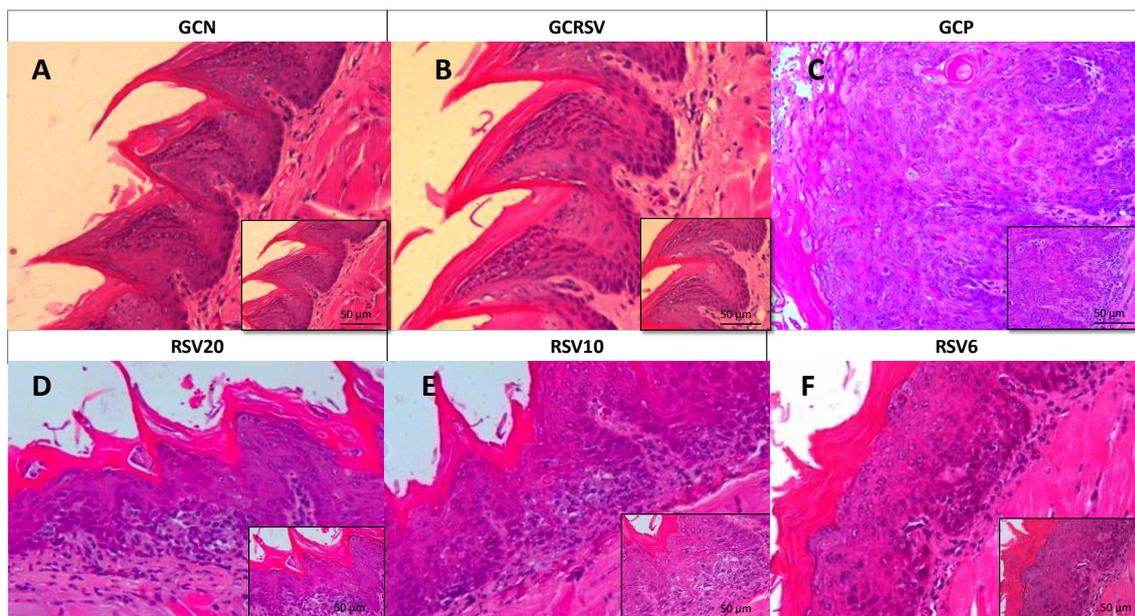
O infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foi mais pronunciado (escore 2, dito moderado) no GCP (60%), e nos grupos teste de 6 (60%) e 10 (55,6%) semanas. Já o grupo teste de 20 semanas apresentou maior frequência de escore 1 (leve) em 60% dos animais analisados, enquanto todos os animais dos GCN e GCRSV não apresentaram alteração (escore 0) ($p < 0,001$) (Tabela 2). Dessa forma, houve redução do grau de inflamação a partir de 20 semanas de uso de Resveratrol.

Tabela 2: Avaliação microscópica, através da classificação adaptada de ANNEROTH (1986), da língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.

	GCN	GCRSV	4NQO				p-Valor
			GCP	RSV6	RSV10	RSV20	
Língua							
Grau de Queratinização							
0	100,0%*	90,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%	<0,001
1	0,0%	10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	
2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	22,2%	50,0%*	
3	0,0%	0,0%	100,0%*	100,0%*	77,8%*	30,0%	
Pleomorfismo Nuclear							
0	80,0%*	100,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	<0,001
1	20,0%	0,0%	0,0%	0,0%	11,1%	30,0%*	
2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	22,2%	30,0%*	
3	0,0%	0,0%	100,0%*	100,0%*	66,7%*	40,0%	
Invasão							
0	100,0%*	100,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	<0,001
1	0,0%	0,0%	0,0%	10,0%	11,1%	30,0%	
2	0,0%	0,0%	90,0%*	90,0%*	88,9%*	60,0%*	
3	0,0%	0,0%	10,0%	0,0%	0,0%	10,0%	
Infiltrado Inflamatório							
0	100,0%*	100,0%*	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	<0,001
1	0,0%	0,0%	20,0%	20,0%	33,3%	60,0%*	
2	0,0%	0,0%	60,0%*	60,0%*	55,6%*	40,0%	
3	0,0%	0,0%	20,0%	20,0%	11,1%	0,0%	

*p<0,05; †Teste qui-quadrado de Pearson (frequência absoluta e percentual); GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas. Grau de queratinização, 0= ausência de alteração; 1= >50%; 2= entre 20 e 50%; 3 = 50%. Pleomorfismo Nuclear, 0= ausência de alteração; 1= 25%; 2=50%; 3= >50%. Estágio de invasão, 0= ausência de alteração; 1= displasia severa; 2= microinvasão de lâmina própria; 3= invasão extensiva de tecidos adjacentes. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, 0= ausência de alteração; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso.

Figura 8: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8 mg/kg/semana em diferentes períodos.

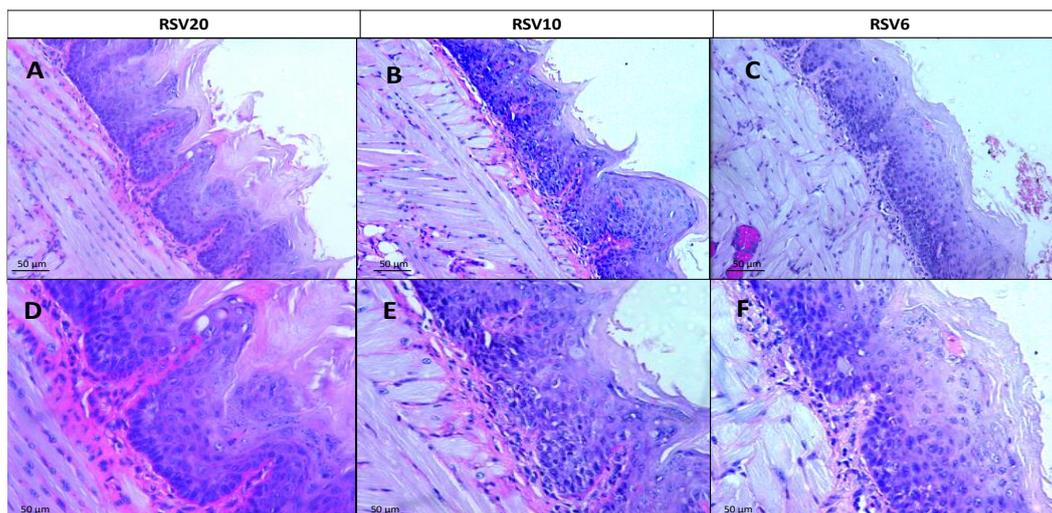


(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20= 4NQO+ Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10= 4NQO+ Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6= 4NQO+ Resveratrol por 6 semanas; (200x e no detalhe 400x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em alguns espécimes dos grupos teste RSV20, RSV10 e RSV6 houve dificuldade na definição do status de invasão da lâmina própria por células epiteliais. Para a confirmação fidedigna foi necessária a realização de análise adicional utilizando coloração histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para a definição dos escores histológicos (Figura 9).

Figura 9: Fotomicrografias da análise adicional da membrana basal do epitélio de língua de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8 mg/kg/semana em diferentes períodos.



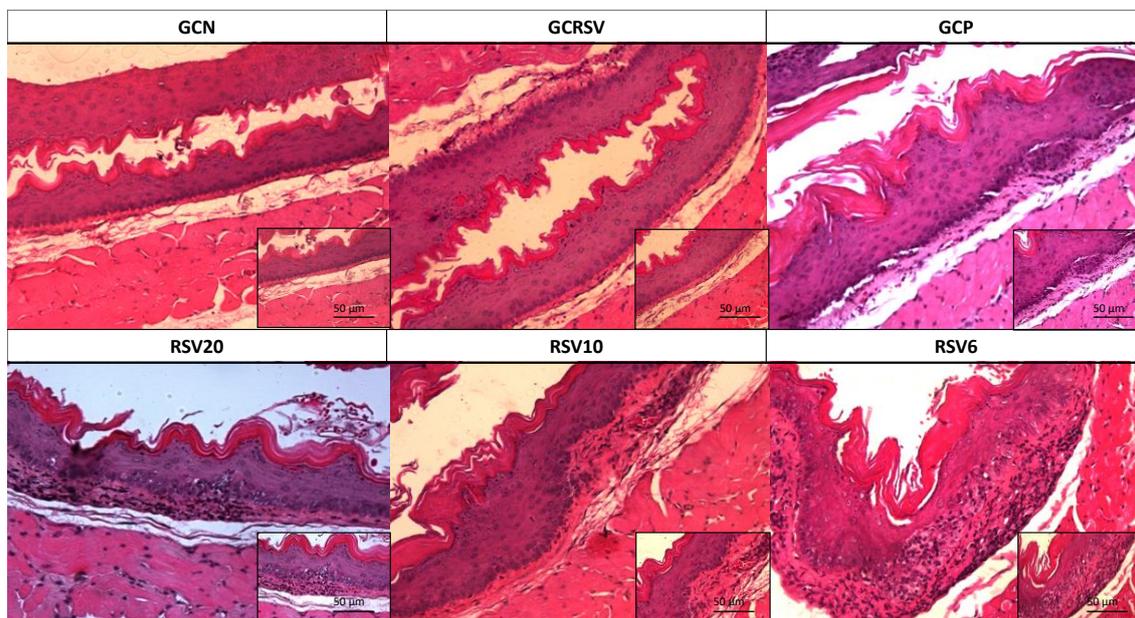
(A) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (B) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (C) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; (A, B e C 200x; D, E e F 400x; Ácido Periódico de Schiff).

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.5 Análise Microscópica do Esôfago

A avaliação histopatológica do esôfago revelou epitélio pavimentoso estratificado hiperortoceratinizado sob tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado com vasos ectásicos e focos inflamatórios na submucosa em todos os grupos, com exceção do GCN e GCRSV ($p < 0,001$). Detectou-se aumento significativo de mitoses, células apoptóticas, pleomorfismo basal e tampões de ceratina em todos os grupos submetidos ao carcinógeno, em comparação aos GCN (0%) e GCRSV (0%) ($p < 0,001$) (Tabela 3) (Figura 10).

Figura 10: Fotomicrografias do esôfago de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



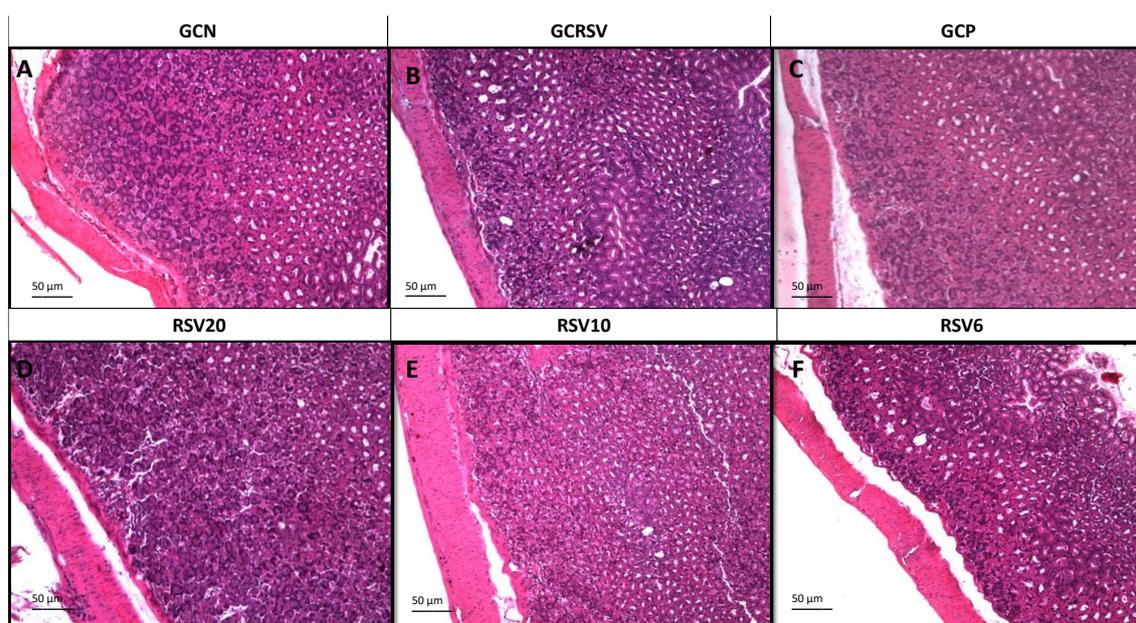
(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; (200x e no detalhe 400x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.6 Análise Microscópica do Estômago

Os animais de todos os grupos que receberam o carcinógeno apresentaram alterações diversas nas regiões avaliadas. Os achados encontrados envolviam mucosa fúndica rarefeita, foco inflamatório, vasos ectásicos e metaplasia intestinal na mucosa gástrica. Entretanto, esses achados não representaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controle negativo e controle RSV (Tabela 3) (Figura 11).

Figura 11: Fotomicrografias do estômago de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; (100x, Hematoxilina-Eosina).

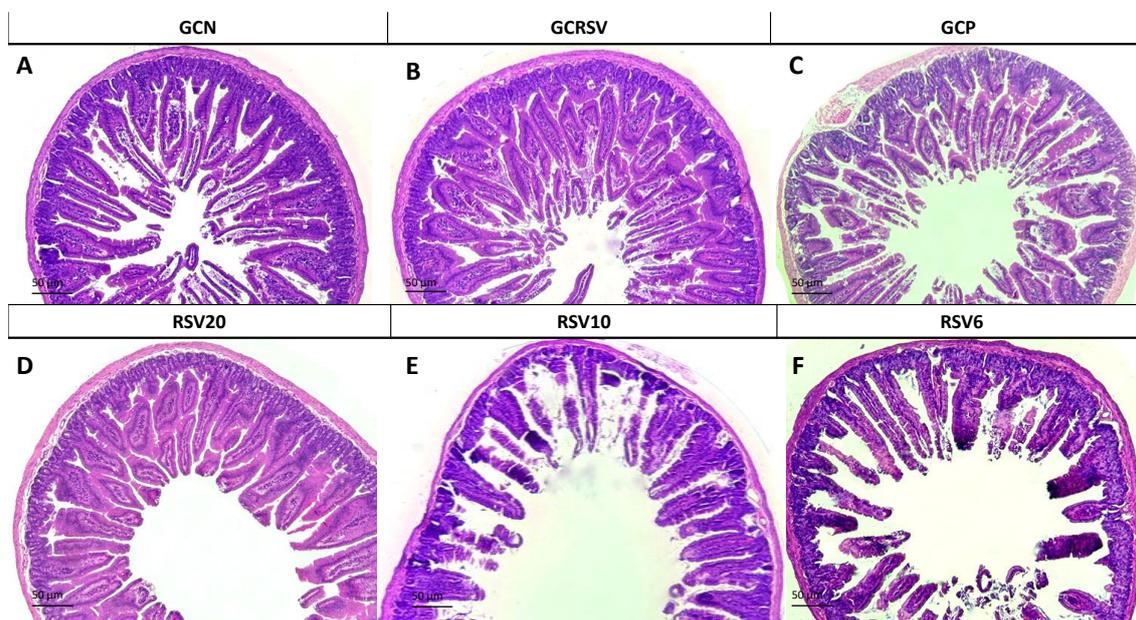
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.7 Análise Microscópica do Intestino

Na análise microscópica verificou-se que o grupo controle positivo e o grupo teste submetido à exposição ao carcinógeno e ao tratamento com RSV por 6 semanas, apresentaram 60% dos animais com achatamento dos vilos. Além disso, a presença de inflamação aguda ou crônica também foi percebida como alteração no grupo controle positivo (100%) e nos grupos teste de 20 (60%), 10 (44,4%) e 6 (50%) semanas, quando comparados aos grupos controle negativo (0%) e controle RSV (0%). A presença de vacuolização foi significativamente aumentada no grupo controle

positivo (60%) e grupos teste de 20 (50%), 10 (55,6%) e 6 (50%) semanas. Em todos os animais o tecido muscular subjacente estava preservado (Tabela 3) (Figura 12).

Figura 12: Fotomicrografias do intestino de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas (100x, Hematoxilina-Eosina).

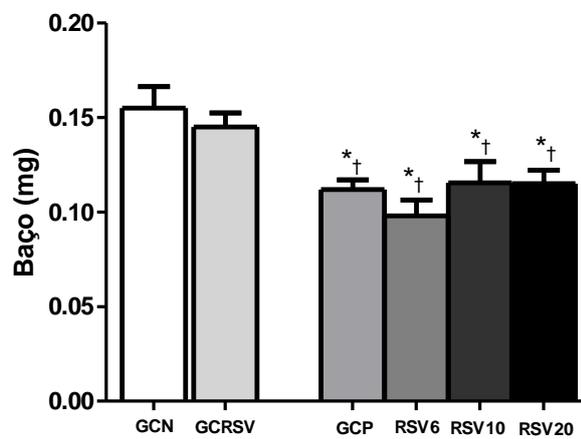
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.8 Análise Microscópica do Baço

A massa do baço foi aferida e normalizada pelo comprimento da tíbia. O achado de redução significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro no GCP ($0,11 \pm 0,005$) e nos três grupo teste, de 20 semanas ($0,11 \pm 0,007$), 10 semanas ($0,11 \pm 0,01$) e 6 semanas ($0,09 \pm 0,008$) foi comum, em comparação ao GCN e GCRSV (Figura 13).

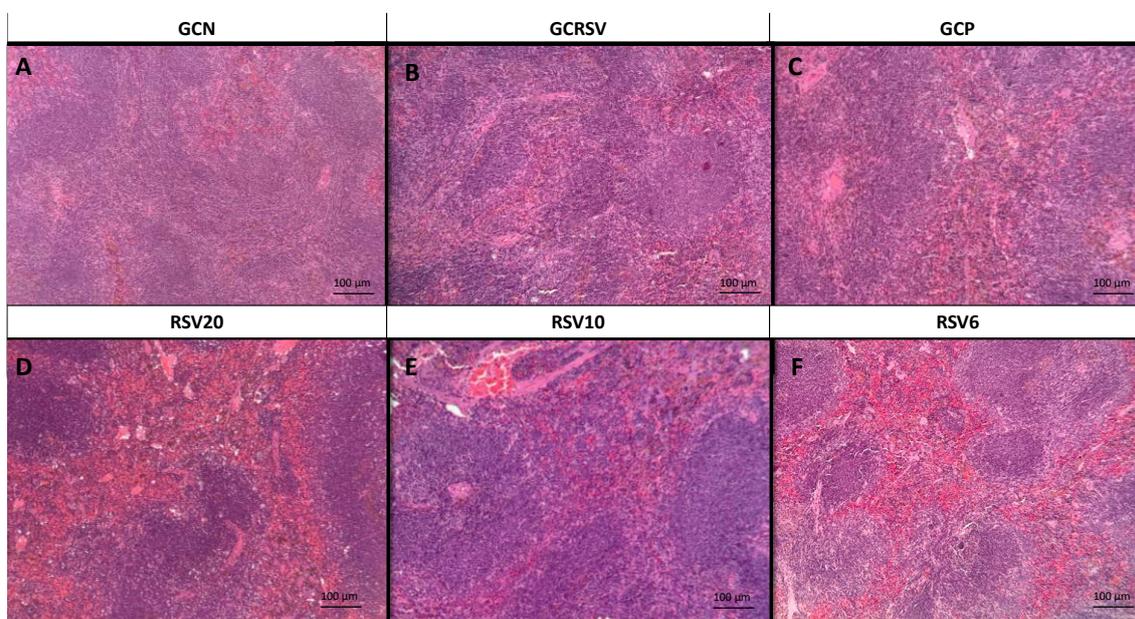
Foi encontrada desproporção das regiões de polpa branca em relação à polpa vermelha de todos os animais submetidos ao carcinógeno, GCP (100%), RSV6 (100%), RSV10 (100%) e RSV20 (100%), com maior ocupação do espaço esplênico por polpa branca. Houve preservação dessa proporção em GCRSV (90%) e em GCN (70%), o que representou diferença significativa entre os grupos. Um achado comum a todos os animais foi a presença de hemorragia (Tabela 3) (Figura 14).

Figura 13: Perfil da massa do baço, normalizada pelo comprimento da tíbia, de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; * $p < 0,05$ vs. GCN; † $p < 0,05$ GCRSV (média \pm EPM); Teste ANOVA/Bonferroni.

Figura 14: Fotomicrografias do baço de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; (200x, Hematoxilina-Eosina).

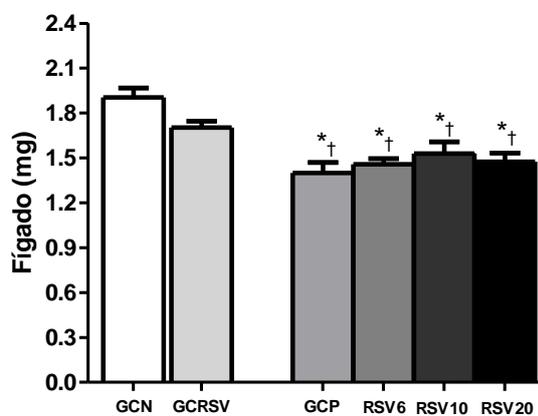
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.9 Análise Microscópica do Fígado

A semelhança do que foi realizada na metodologia do baço, a massa do fígado foi corrigida pelo comprimento da tíbia dos animais. Foi encontrada redução da massa do órgão de forma significativa ($p < 0,05$) nos grupos que tiveram contato com o carcinógeno 4NQO, independente do tratamento com RSV, em comparação aos grupos controle negativo e RSV. Os valores estão descritos a seguir: GCP ($1,4 \pm 0,07$); RSV20 ($1,47 \pm 0,05$); RSV10 ($1,53 \pm 0,07$) e RSV6 ($1,45 \pm 0,03$) (Figura 15).

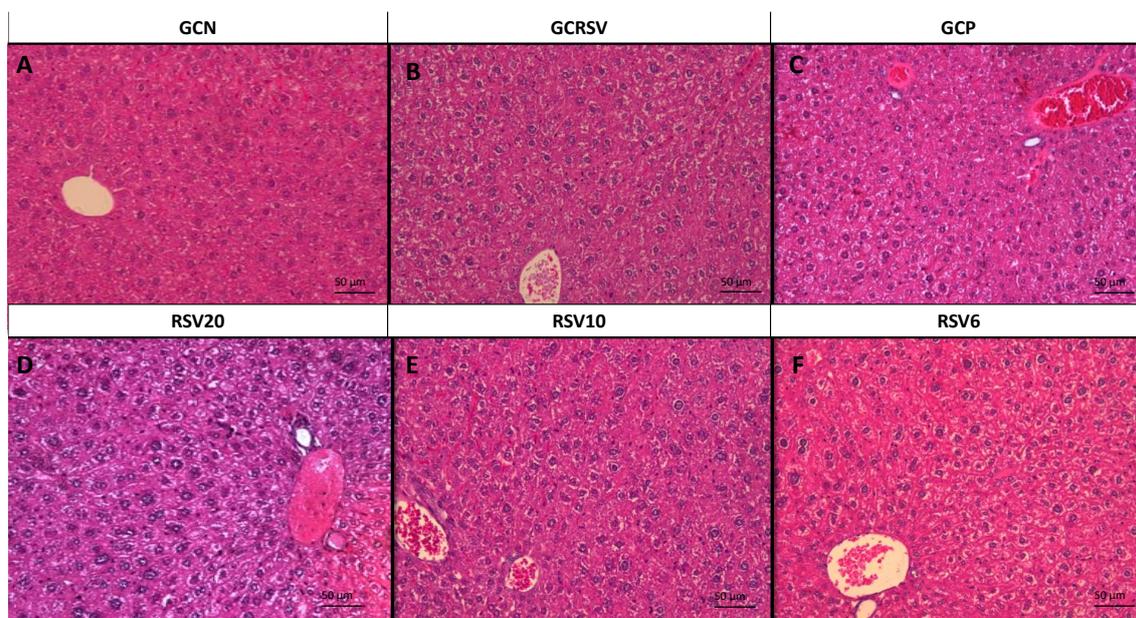
Alterações hepáticas foram encontradas em todos os grupos, como presença de infiltrado inflamatório, tumefação celular, hiperplasia de células de Kupffer e hemorragia sinusoidal, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais avaliados. Não foram encontrados vestígios de necrose focal ou esteatose nos espécimes analisados (Tabela 3) (Figura 15).

Figura 15: Perfil da massa do fígado, normalizada pelo comprimento da tíbia, de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; * $p < 0,05$ vs. GCN; † $p < 0,05$ GCRSV (média \pm EPM); Teste ANOVA/Bonferroni.

Figura 16: Fotomicrografias do fígado de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas (200x, Hematoxilina-Eosina).

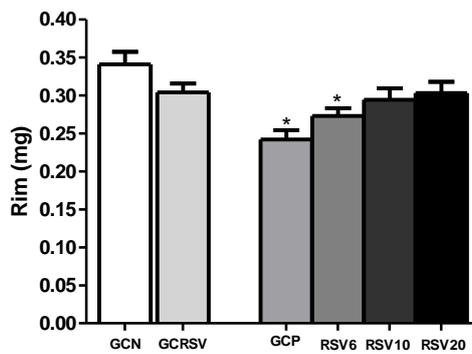
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.10 Análise Microscópica do Rim

No tocante a comparação do somatório das massas dos rins direito e esquerdo, normalizada pelo comprimento da tibia, os achados foram de redução significativa ($p < 0,05$) na massa do órgão apenas do grupo teste tratado por 6 semanas ($0,27 \pm 0,01$) e grupo controle positivo ($0,24 \pm 0,01$), em comparação aos demais grupos experimentais (Figura 17).

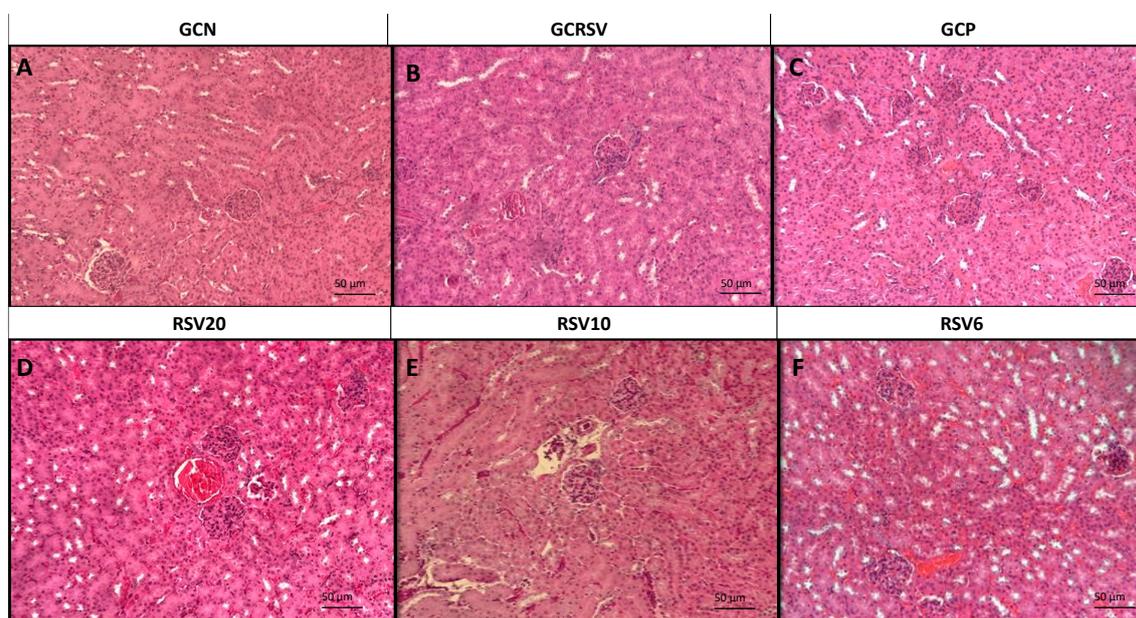
O aumento do infiltrado inflamatório foi presente em todos os grupos teste (100%), independente do tratamento com RSV e no GCP (60%) ($p < 0,05$), com exceção dos GCN (20%) e GCRSV (0%). Outros achados como tumefação celular, presença de cilindros hialinos e hemorragia foram comuns a todos os grupos, não representando diferença estatística significativa (Tabela 3) (Figura 18).

Figura 17: Perfil das massas dos rins direito e esquerdo, normalizada pelo comprimento da tibia, de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; * $p < 0,05$ vs. GCN, GCRSV, RSV10 e RSV20 (média \pm EPM); Teste ANOVA/Bonferroni.

Figura 18: Fotomicrografias do rim de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCRSV = grupo controle Resveratrol; (C) GCP = grupo controle positivo; (D) RSV20 + 4NQO = Resveratrol por 20 semanas; (E) RSV10 + 4NQO = Resveratrol por 10 semanas; (F) RSV6 + 4NQO = Resveratrol por 6 semanas (200x, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3: Avaliação microscópica do fígado, rim, esôfago, baço, intestino e estômago de camundongos *Swiss* submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4NQO e tratados com Resveratrol 8mg/kg em diferentes períodos.

	GCN	GCRSV	4NQO				p- Valor
			GCP	RSV6	RSV10	RSV20	
Fígado							
Infiltrado Inflamatório	60,0%	20,0%	60,0%	50,0%	55,6%	50,0%	0,480
Tumefação Celular	100,0%	90,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,418
Hiperplasia de Células de Kupffer	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
Hemorragia Sinusoidal	100,0%	90,0%	100,0%	100,0%	100,0%	90,0%	0,544
Necrose Focal	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
Esteatose	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
Rim							
Tumefação Celular	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
Infiltrado Inflamatório	20,0%	0,0%	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	<0,001
Cilindro Hialino	50,0%	60,0%	66,7%	50,0%	55,6%	60,0%	0,976
Hemorragia	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
Esôfago							
Epitélio contínuo	100,0%	100,0%	50,0%	50,0%	44,4%	50,0%	0,008
Vasos ectásicos	0,0%	0,0%	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	<0,001
Foco inflamatório submucosa	0,0%	10,0%	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	<0,001
Mitose e Células apoptóticas	0,0%	0,0%	90,0%*†	90,0%*†	77,8%*†	80,0%*†	<0,001
Tampões ceratina	0,0%	0,0%	50,0%*†	60,0%*†	55,6%*†	60,0%*†	<0,001
Pleomorfismo basal	0,0%	0,0%	100,0%*†	100,0%*†	100,0%*†	80,0%*†	<0,001
Baço							
Proporção polpa vermelha e branca	70,0%	90,0%	0,0%*†	0,0%*†	0,0%*†	0,0%*†	<0,001
Hemorragia	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
Intestino							
Achatamento dos vilos	0,0%	0,0%	60,0%*†	60,0%*†	33,3%	30,0%	0,004
Perda das criptas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
Inflamação aguda/crônica	0,0%	0,0%	100,0%*†	50,0%*†	44,4%*†	60,0%*†	<0,001
Vacuolização	0,0%	0,0%	60,0%*†	50,0%*†	55,6%*†	50,0%*†	0,004
Preserv. Tecido muscular	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
Estômago							
Mucosa fúndica preservada	100,0%	100,0%	80,0%	80,0%	77,8%	80,0%	0,444
Mucosa fúndica rarefeita	0,0%	0,0%	10,0%	20,0%	22,2%	20,0%	0,426
Hemorragia	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,000
Foco inflamatório	0,0%	0,0%	20,0%	20,0%	22,2%	20,0%	0,444
Vasos ectásicos	0,0%	0,0%	20,0%	20,0%	22,2%	20,0%	0,444
Metaplasia Intestinal Mucosa	0,0%	0,0%	30,0%	20,0%	22,2%	20,0%	0,309
Gástrica							

GCP = grupo controle positivo; GCRSV = grupo controle Resveratrol; GCN = grupo controle negativo; RSV20 = 4NQO + Resveratrol por 20 semanas; RSV10 = 4NQO + Resveratrol por 10 semanas; RSV6 = 4NQO + Resveratrol por 6 semanas; *p<0,05 vs. GCN; †p<0,05 GCRSV, teste qui-quadrado ou exato de Fisher (%) (n=10/grupo).

7 DISCUSSÃO

O modelo animal de carcinogênese oral reproduzido no presente estudo é o mais comumente utilizado na literatura. O composto 4NQO introduz mutações aleatórias através de reações irreversíveis em DNA e induz estresse oxidativo intracelular, pela geração das espécies reativas de oxigênio (ROS), que geram dano adicional e contribuem para a progressão tumoral. A patologia induzida pelo 4NQO se aproxima àquela encontrada em humanos, particularmente na progressão dos tumores, com a possibilidade da observação de lesões em diferentes estágios (SAGHEER et al. 2021). Os tumores na língua dos camundongos que tiveram contato com o 4NQO mostraram progressão desde displasia leve até carcinoma invasivo de células escamosas.

Por se tratar de um carcinógeno, o 4NQO gera efeitos sistêmicos variáveis no organismo. A massa corpórea dos animais em contato com o 4NQO foi afetada, havendo redução do peso a partir da semana 14 até o fim do experimento. O resultado é semelhante ao observado por Steidler & Reade (1984) que, em modelo de uso tópico, os animais apresentaram, a partir da 16ª semana de experimento, discreta perda de massa corpórea. No estudo de Sahu et al. (2023), apesar da metodologia utilizar ratos e a administração do carcinógeno ser realizada através da água de beber, os animais expostos ao 4NQO também apresentaram redução significativa da massa corpórea ao longo do experimento, quando comparados ao grupo controle. A alteração, provavelmente, é devido ao efeito catabólico induzido pelo carcinógeno (BARCESSAT et al. 2014), parcialmente explicado pelas alterações sistêmicas que serão descritas na sequência. O GCN também apresentou redução de peso, o que corrobora com o estudo de LUPTAKOVA et al. (2021), assumindo que é necessário manter as concentrações de DMSO como veículo o mais reduzidas quanto possível, a fim de não afetar a homeostase celular, visto que esse solvente é citotóxico em altas concentrações.

Na análise hematológica, a contagem absoluta de leucócitos e linfócitos e relativa e absoluta de segmentados demonstrou que os grupos que entraram em contato com o carcinógeno apresentaram aumento significativo do número dessas células circulantes, quando comparado aos GCN e GCRSV ($p < 0,001$). Esse achado é compatível com o de Sahu et al. (2023), que em estudo de 24 semanas, detectou que certas células da linhagem mielóide aumentavam nos grupos com os tumores desenvolvidas por 4NQO, como os eosinófilos, monócitos e macrófagos, entretanto, o

número de neutrófilos estava reduzido nesses grupos, quando comparado ao controle. Os neutrófilos são conhecidos como a primeira linha de defesa contra lesões ou infecções. A compreensão do papel dos neutrófilos associados a tumores (TANs) permanece ambígua, devido à mudança para estados de ativação com propriedades pró e antitumorais, bem como a falta de marcadores específicos, dificulta sua compreensão (PELTANOVA et al. 2019). Entretanto, a neutrofilia pode ser justificada por sua relação com a hipóxia, privação de nutrientes, e à necrose encontrada no microambiente tumoral (MT) que ao liberarem Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), recrutam e ativam neutrófilos, do mesmo modo que citocinas derivadas do tumor promovem diferenciação mieloide (SINGEL & SEGAL, 2016). No que tange a análise absoluta de linfócitos, é sabido que essas células são os principais efetores imunológicos nos cânceres de cabeça e pescoço (SHAN et al. 2020), o que justifica sua quantidade circulante aumentada nos grupos teste e controle positivo.

A aplicação tópica do 4NQO por 20 semanas no presente trabalho foi capaz de gerar alterações significantes nos tecidos linguais dos camundongos expostos ao carcinógeno. Na análise macroscópica, foram detectadas lesões visíveis ora únicas, ora múltiplas de tamanhos variados, como tipicamente são encontrados nos cânceres da cavidade bucal, semelhante ao padrão dos achados no estudo de Osei-Sarfo et al. (2013). Os padrões variavam entre elevações e placas. Alguns animais apresentaram lesões pontuais em outras regiões, como palato duro e mucosa perioral, porém esses achados foram ocasionais e não representaram diferença estatística entre os grupos. A baixa frequência desses achados é compatível com outros estudos da literatura (NAIK et al. 2021; TANG et al. 2004).

Essas lesões foram categorizadas histologicamente para acessar o efeito do Resveratrol na severidade das alterações, as quais foram graduadas em escores histológicos e pesquisa da presença de alterações arquiteturais e celulares. A avaliação histopatológica dos tecidos linguais revelou desde displasias (moderadas e severas), microinvasão da lâmina própria até carcinomas com invasão extensiva de tecidos adjacentes. Foram observadas alterações arquiteturais e celulares estatisticamente significantes nos tecidos linguais dos animais submetidos ao contato com o carcinógeno, independente do tratamento com Resveratrol, como estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, cristas em forma de gota, aumento do número de figuras mitóticas, diskeratose, pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular,

figuras mitóticas típicas e atípicas e hipercromasia. Essas alterações são compatíveis com as encontradas nos estudos de Naik et al. (2021), Barcessat et al. (2014), Osei-Sarfo et al. (2013) e Vered et al. (2007).

O infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foi classificado de acordo com os critérios adaptados de Anneroth (1986) e apontou que o grupo teste tratado com Resveratrol por 20 semanas apresentou menor escore, 1 (leve), em comparação aos demais grupos que receberam o carcinógeno (escore 2, dito moderado). Zhang et al. (2013) também observou o efeito inibitório do Resveratrol na inflamação e no estresse oxidativo na artéria carótida de ratos através da supressão da via NF- κ B. Além desse trabalho, Capiralla et al. (2012) também escreveu acerca do bloqueio da via NF- κ B pelo Resveratrol e acrescentou a influência da inibição da via STAT na diminuição da produção de fatores inflamatórios por esse polifenol natural em estudo com linhagem de células, o que poderia justificar, no presente estudo, o menor escore encontrado no grupo tratado com Resveratrol por mais tempo. Já no trabalho de Naik et al. (2021) que fez uso do modelo de carcinogênese com 4NQO, observou-se que os animais que não desenvolveram tumores apresentaram grau mínimo de inflamação, o que corrobora com os achados do presente estudo referentes aos grupos controle negativo e RSV. Por outro lado, a inflamação foi mais proeminente em línguas de animais com o câncer, em áreas de invasão perineural e adjacente a grandes vasos sanguíneos, também observado no nosso experimento.

Semelhantemente ao padrão de escore de inflamação, o grau de pleomorfismo celular e o grau de queratinização foram significativamente menores no grupo teste tratado por 20 semanas, em comparação aos escores dos demais grupos que receberam o carcinógeno. Em animais irradiados, o efeito do Resveratrol foi similar, interferindo no pleomorfismo celular em glândula parótida, além de diminuição da vacuolização citoplasmática (ALMEIDA, 2017). Da mesma forma, Xu et al. (2013) observou que camundongos irradiados e tratados com Resveratrol por via intraperitoneal (20 mg/kg/d) apresentaram alterações morfológicas mais sutis em glândula submandibular, quando comparados ao grupo que não recebeu o Resveratrol. Por fim, os tumores que são classificados como pobremente diferenciados mostram mais alterações morfológicas, como diminuição do grau de queratinização, sendo essa classificada como mínima ou ausente (JOHNSON et al. 2011).

Entretanto, no quesito de análise invasão, independente do tratamento com Resveratrol, todos os animais que tiveram contato com o 4NQO desenvolveram tumores em língua, diferentemente dos achados de Shrotriya et al. (2015), que em administração do Resveratrol na dieta por 8 semanas observou redução moderada da incidência, multiplicidade e gravidade das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas induzidas pelo 4NQO, entretanto, nesse estudo, os animais foram expostos ao carcinógeno em água de beber por 16 semanas e não chegaram a desenvolver o estágio de carcinoma. Em outro estudo, foi utilizada a combinação terapêutica do Resveratrol com o 5-fluorouracil, um quimioterápico, em língua de camundongos submetidos a modelo de carcinogênese com 4NQO e constatou-se a regressão do estágio de carcinoma para displasia moderada (EL-ORABY et al. 2020). Nesse sentido, é necessário cautela na interpretação de resultados desse fitoterápico, visto que, apesar de diversos estudos alcançarem achados promissores, ainda existem resultados inconsistentes, o que poderia ser, em parte, devido às dosagens e formulações empregadas. Apesar desse achado de Shrotriya et al. (2015), ainda é inconclusivo se o efeito do Resveratrol é suficiente como agente no tratamento de câncer de boca.

A mucosa encontrada em região de cabeça e pescoço é contínua com o esôfago, dessa forma, os dois tecidos compartilham organização celular, funções e suscetibilidade à doença. Tanto os carcinomas de cabeça e pescoço, quanto os carcinomas de esôfago compartilham lesões genéticas e fatores de risco ambientais relacionados ao estilo de vida, como exposição ao tabaco e ao álcool. Ressaltando essa semelhança, animais tratados com o modelo de carcinogênese com 4NQO administrado em água de beber por 16 semanas desenvolveram prontamente ambos os carcinomas, em língua e em esôfago (FLASHNER et al. 2022). No presente estudo, a administração tópica do carcinógeno por 20 semanas também foi capaz de induzir em esôfago alterações como aumento significativo de mitoses, células apoptóticas, pleomorfismo basal e de tampões de ceratina, semelhante aos achados do estudo de Tanaka et al (2017), que, ao administrar o 4NQO em água de beber por 8 semanas, observou o desenvolvimento de lesões proliferativas e displásicas em esôfago. O uso repetitivo e crônico da cânula de gavagem pode, por vezes, causar perturbação da arquitetura celular e do tecido mucoso em esôfago, entretanto, semelhantemente ao estudo de Kinder et al. (2014), não ocorreram alterações físicas graves indicativas de resposta inflamatória em qualquer um dos grupos de tratamento via gavagem.

Ainda nas análises realizadas em nível sistêmico, as alterações histomorfológicas do baço evidenciaram redução da massa esplênica nos animais que receberam o 4NQO, independente do tratamento com o RSV, em comparação aos grupos controle negativo e controle RSV, além de desproporção entre a polpa branca e vermelha nesses camundongos, havendo redução da porção branca. Esse achado corrobora em parte com a pesquisa de Sahu et al. (2023), que descreveu uma notável redução no tamanho dos baços de ratos expostos ao 4NQO após 24 semanas. Por outro lado, Gannot et al. (2004) encontrou que os baços de ratos que receberam o 4NQO em água de beber apresentaram aumento de tamanho quase duas vezes maior que o grupo controle, além disso, observou proporção mantida entre as regiões de polpa branca e vermelha. Já no estudo de Barcessat et al. (2014), observou-se redução da celularidade na zona marginal de polpa branca nos animais após 16 semanas, entretanto, a metodologia utilizou ratos *Wistar* fêmeas, o que pode ter contribuído em parte para a divergência dos resultados.

As alterações encontradas em fígado foram comuns e variáveis entre os grupos, entretanto não houve diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados. Há características peculiares em roedores que explicam a observação dessas alterações, como a clara identificação das células de Kupffer, mostrando hiperplasia, não sendo um achado comum em humanos. Além disso, os roedores costumam apresentar padrões de resposta inflamatória focal e/ou cordões constituídos por linfócitos isolados ou acompanhados de neutrófilos, diante da presença de diversas substâncias químicas. A presença de áreas de edema e hemorragia sinusoidal também são alterações observadas em geral nos roedores (GIRÃO-CARMONA et al. 2021). Esses achados também foram encontrados no grupo controle tratado com DMSO no estudo de Vasconcellos et al. (2007), o que pode apontar uma possível interferência em nível hepático dessa substância.

No tocante à análise do rim, houve aumento significativo do infiltrado inflamatório nesse órgão nos grupos teste que receberam o carcinógeno, independente do tempo de tratamento com o Resveratrol, e no GCP. Essa elevação é compatível com os achados de Barcessat et al. (2014) e Viswanadha et al. (2011) que também encontraram potencial toxicidade renal pela aplicação tópica do 4NQO, o que foi atribuída a um excessivo estresse oxidativo causado pelo carcinógeno nesse órgão. Achados comuns a todos os grupos sem diferença significativa foram a presença de

cilindros hialinos que, ocasionalmente dispersos, são frequentemente encontrados e sem maior significado clínico e a presença de hemorragia, visto que as arteríolas arqueadas estão fisiologicamente congestionadas, possivelmente devido a alterações no momento da eutanásia (GIRÃO-CARMONA et al. 2021). Esses achados são ditos fisiológicos, dado que o Resveratrol não apresenta efeitos adversos em rim, exceto quando em altas dose (acima de 300mg/kg), baseado em estudo de Crowell et al. (2004), que verificou a toxicidade renal desse fitoterápico em ratos através de enzimas renais.

Ainda na análise sistêmica do efeito do Resveratrol no modelo de carcinogênese, o estômago não apresentou alterações estatisticamente significantes entre os grupos avaliados. Da mesma forma, o estudo de Tang et al. (2004) não detectou mudanças na estrutura desse órgão em diferentes linhagens de camundongos fêmeas após o contato com o carcinógeno seja por administração tópica três vezes na semana ou por água de beber diariamente durante 16 semanas, em comparação ao grupo controle.

Entretanto, no intestino, os grupos que receberam o carcinógeno, independente do tempo de tratamento com Resveratrol, apresentaram aumento dos focos inflamatórios e de vacuolização. Além disso, o GCP e o grupo teste que recebeu o tratamento com o Resveratrol por menor tempo (6 semanas) tiveram seus vilos menos preservados. Os resultados são compatíveis com o achado de Zhuang et al. (2019), que, em estudo com linhagem de células, observou que o RSV conseguiu atenuar o dano celular químico nesse órgão, através do aumento da viabilidade celular e da diminuição das taxas de apoptose. Assim, especula-se que esse fitoterápico reduz as injúrias intestinais e a ruptura de barreiras protetoras através da regulação positiva do estado oxidativo. O intestino delgado é o principal sítio de absorção e metabolismo do RSV. Dessa forma, levanta-se a hipótese de que o epitélio intestinal pode ser um potencial alvo do fitoterápico, através do efeito de primeira passagem e preservação da microbiota (ANNUNZIATA et al. 2019).

8 CONCLUSÃO

O modelo de indução carcinogênica animal com o 4NQO associado ao tratamento com o Resveratrol, por diferentes períodos, utilizado nesse estudo, permitiu o desenvolvimento de alterações epiteliais em língua, desde displasias severas até carcinomas com invasão extensiva de tecidos adjacentes, bem como alterações sistêmicas em nível esofágico, esplênico, hepático, renal e intestinal. Além disso, também houve modificação da massa corpórea dos camundongos e alterações hematológicas consideráveis, independente do tempo de tratamento com o Resveratrol. Apesar desses achados, observou-se que esse composto natural conseguiu preservar, em parte, os vilos intestinais dos animais que fizeram uso por pelo menos 10 semanas da substância e conseguiu atenuar o infiltrado inflamatório e o grau de queratinização nas regiões dos tumores de língua quando utilizado por 20 semanas.

Embora exista uma grande diversidade de estudos experimentais que produziram evidências a favor dos benefícios biológicos do Resveratrol na carcinogênese, ainda há obstáculos para a sua translação em nível de prática clínica.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S. et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, v. 77, n. 1, p. 63–71, 1994.

ALMEIDA, L. C. G. Efeito do resveratrol e das vitaminas C e E em glândulas parótidas de ratos submetidos à radioterapia. <https://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/7728>, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

ANNUNZIATA, G. et al. Effects of Grape Pomace Polyphenolic Extract (Taurisolo®) in Reducing TMAO Serum Levels in Humans: Preliminary Results from a Randomized, Placebo-Controlled. Cross-Over Study. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 139, 2019.

BAEK, S. H. et al. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. *Phytomedicine*, v.23 n. 5 p. 566-577, 2016.

BARCESSAT, A. R. R. et al. Systemic toxic effects during early phases of topical 4NQO-induced oral carcinogenesis in rats. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 43, n. 10, p. 770–777, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERRETTA, M., BIGNUCOLO, A., DI FRANCIA, R., COMELLO, F., FACCHINI, G., CECCARELLI, M., ... MAUREA, N. Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8, p. 2945, 2020.

BERTA, G. N., SALAMONE, P., SPRIO, A. E., DI SCIPIO, F., MARINOS, L. M., SAPINO, S., CARLOTTI, M. E., CAVALLI, R., AND DI CARLO, F. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Oral Oncology*. v. 46, n. 1, p. 42-48, 2010.

BHATT, S. R., LOKHANDWALA, M. F., BANDAY, A. A. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 667, n. 1-3, p. 258–264, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Estimativa 2020, Incidência de câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Inca, 2020.

CAPIRALLA, H. et al. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *Journal of Neurochemistry*, v. 120, n. 3, p. 461–472. 2011.

- CHEN, L. XIA, J-S. WU, J-H. CHEN, Y-G. QIU, C-J. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma cells proliferation while promoting apoptosis through inhibition of CBX7 protein. *Environmental Toxicology*, 2020.
- CROWELL, J. A.; KORYTKO, P. J.; MORRISSEY, R. L.; BOOTH, T. D.; LEVINE, B. S. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences*, v. 82, n. 2, p.614–619, 2004.
- DAYAKAR, A.; SHETTY, P.; DAYAKAR, M. M. The Expression of p63 Protein in Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma- An Immunohistochemical Study. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, v. 8, n. 44, 2019.
- EL-ORABY, D. et al. Synergistic Effect of Resveratrol with 5-Fluorouracil in Chemotherapy of Induced Oral Squamous Cell Carcinoma. *Dental Science Updates*, v. 1, n. 2, p. 161–174, 2020.
- FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *International Journal of Cancer*, 2021.
- FLASHNER, S. et al. Modeling Oral-Esophageal Squamous Cell Carcinoma in 3D Organoids. *Journal of Visualized Experiments*, n. 190, 2022.
- FURQAN, M. et al. STAT inhibitors for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, v. 6, p. 90, 2013.
- GANNOT G, BUCHNER A, KEISARI Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline-N-oxide in mice. *Oral Oncology*, v. 40, n. 3, p.287–97, 2004.
- GEIGER, J. L.; GRANDIS, J. R.; BAUMAN, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncology*, v. 56, p. 84–92, 89 2016.
- GELETU, M. et al. Engaged for survival: From cadherin ligation to STAT3 activation. *JakStat*, v. 2, n. 4, p. e27363, 2013.
- GIRÃO-CARMONA. V. C. C.; DA SILVA, A. S. R.; LEITE, A. C. R. M. *Histologia interativa : roteiros de pesquisa / Fortaleza : Grupo Educação, Tecnologia e Saúde da Universidade Federal do Ceará: Liga Acadêmica de Embriologia e Microscopia Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará*, 2021.
- HAGDORN, Q. A. J.; BOSSERS, G. P. L.; KOOP, A. M. C.; PIEK, A.; EIJGENRAAM, T. R.; VAN DER FEEN, D. E.; ... BERGER, R. M. F. A novel method optimizing the normalization of cardiac parameters in small animal models: the importance of dimensional indexing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Rio de Janeiro: INCA*, 2022.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. E. K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and a etiology. *Periodontology* 2000, v. 57, n. 1, p. 19–37, 2011.

KAMRAN, M. Z.; PATIL, P.; GUDE, R. P. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed research international*, v. 2013, p. 421821, 2013.

KANOJIA D, VAIDYA MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*, v. 42, n. 7, p. 655-667, 2006.

KAPLAN, I., HOCHSTADT, T., DAYAN, D. PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. *Med Oral*, v. 7, n. 5, p. 336-343, 2002.

KIERSZEMBAUM, A. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, p.19-22, 2004.

KIJIMA, T. et al. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, v. 13, n. 8, p. 355–62, 2002.

KIM, C.-W.; HWANG, K.-A.; CHOI, K.-C. Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm.* v. 23, p. 1787–1796, 2016.

KINDER, J. M. et al. Long-term repeated daily use of intragastric gavage hinders induction of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Comparative Medicine*, v. 64, n. 5, p. 369–376, 2014.

KOTHA, A. et al. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 3, p. 621-629, 2006.

JOHNSTON, P. A. et al. HCS Campaign to Identify Selective Inhibitors of IL-6-Induced STAT3 Pathway Activation in Head and Neck Cancer Cell Lines. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 13, n. 7, p. 356–376, set. 2015.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; WATERHOUSE, A. L.; DE LA TORRE-BORORAT, M.C. Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 43, p. 281- 283, 1995.

LEONG, P.L., ANDREWS, G.A., JOHNSON, D.E., DYER, K.F., XI, S., MAI, J.C., ROBBINS, P.D., GADIPARTHI, S., BURKE, N.A., WATKINS, S.F., GRANDIS, J.R. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, p. 4138–4143, 2003.

LEVY, D. E. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, v. 55, n. 12, p. 1559–1567, 1999.

LI, W.; MA, J.; MA, Q.; LI, B.; HAN, L.; LIU, J.; XU, Q.; DUAN, W.; YU, S.; WANG, F.; et al. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF- κ B pathway. *Current Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 4185–4194, 2013.

LOPEZ, L. R., BLEICH, R. M., & ARTHUR, J. C. Microbiota Effects on Carcinogenesis: Initiation, Promotion and Progression. *Annual Review of Medicine*, v. 72, n.1, p. 243-261, 2020.

LUPTAKOVA, L.; DVORCAKOVA, S.; DEMCISAKOVA, Z.; BELBAHRI, L.; HOLOVSKA, K; PETROVOVA, E. Dimethyl Sulfoxide: Morphological, Histological, and Molecular View on Developing Chicken Liver. *Toxics*, v. 9, n. 3, p. 55, 2021.

MALAGUARNERA, L. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients*, v. 11, n. 946, 2019.

MIRANDA-FILHO A. & BRAY F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncology*, v. 102, 2020.

MÜLLER, S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head and Neck Pathology*, v. 11, n. 1, p. 33–40, 2017.

NAGPAL, J. K.; MISHRA, R.; DAS, B. R. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer*, v. 94, n. 9, p. 2393–2400, 2002.

NAIK, K. et al. The Histopathology of Oral Cancer Pain in a Mouse Model and a Human Cohort. *Journal of Dental Research*, v. 100, n. 2, p. 194–200, 2020.

OSEI-SARFO, K. et al. The molecular features of tongue epithelium treated with the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide and alcohol as a model for HNSCC. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 11, p. 2673–2681, 2013.

PELTANOVA B, RAUDENSKA M, MASARIK M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Molecular Cancer*, v. 8, n. 63, 2019.

PRYOR, W. A; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology*, v. 268, p. 699-722, 1995.

REN, B., KWAH, M. X.-Y., LIU, C., MA, Z., SHANMUGAM, M. K., DING, L., ... GOH, B. C. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters*, v. 515, p. 63–72, 2021.

- SAGHEER, S. H.; WHITAKER-MENEZES, D.; HAN, J. Y. S.; CURRY, J. M.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.; PHILP, N. J. 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *Methods in Cell Biology Carcinogen-driven mouse models of oncogenesis*, v. 163, p. 93-111, 2021.
- SAHU, S. R. et al. 4-nitroquinoline 1-oxide induces immune cells death to onset early immunosuppression during oral squamous cell carcinoma development. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023.
- SAUTTER, C.K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3. p.437-442, 2005.
- SENGOTTUVELAN, M., & NALINI, N. Dietary supplementation of resveratrol suppresses colonic tumour incidence in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by modulating biotransforming enzymes and aberrant crypt foci development. *British Journal of Nutrition*, v. 96, n. 1, p. 145, 2006.
- SHAN Z, LIU S, YANG L, LIU Z, HU Y, YAO Z, et al.. Repertoire of peripheral t cells in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*, v. 26, p. 885–893, 2020.
- SHINRIKI, S. et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor 98 angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 17, 2009.
- SHROTRIYA, S.; TYAGI, A. DEEP, G. ORLICKY, D. J.; et al. Grape Seed Extract and Resveratrol Prevent 4-Nitroquinoline 1-Oxide Induced Oral Tumorigenesis in Mice by Modulating AMPK Activation and Associated Biological Responses. *Molecular Carcinogenesis*, v. 54, p. 291–300, 2015.
- SINGEL, K. L. & SEGAL, B. H. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological Reviews*, v. 273, n. 1, p. 329–343, 2016.
- SINGH, S.K.; BANERJEE, S.; ACOSTA, E.P.; LILLARD, J.W.; SINGH, R. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*, 8, 17216–17228, 2017.
- STEIDLER, N. E. & READE, P. C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-nitroquinolone 1-oxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v. 57, p. 524–31, 1984.
- TANAKA, T.; KAWABATA, K.; SUGIE, S. 4-Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Tongue and Esophagus Carcinogenesis in Obese and Diabetic TSOD Mice. *World Journal of Oncology*, v. 8, n. 4, p. 97–104, 2017.
- TANG, X-H. et al. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 1, p. 301–313, 2004.

VASCONCELLOS, M. C., BEZERRA, D. P., FONSECA, A. M., PEREIRA, M. R. P., LEMOS, T. L. G., PESSOA, O. D. L., PESSOA, C., MORAES, M. O., ALVES, A. P. N. N., COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of Biflorin, ano-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VERED, M. et al. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncology*, v. 43, n. 10, p. 999–1006, 2007.

VISWANADHA, V. P.; SIVAN, S.; RAJENDRA SHENOI, R. Protective effect of *Spirulina* against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. *Molecular Biology Reports*, v. 38, p. 309–317, 2011.

WANG, J., LEI, K., HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European review for medical and pharmacology sciences*, v. 22, n. 12, p. 3855-3864, 2018.

WANG, S., WANG, Z., YANG, S., YIN, T., ZHANG, Y., QIN, Y., WEINREB, R. N., SUN, X., Tissue distribution of trans-resveratrol and its metabolites after oral administration in human eyes. *Journal of Ophthalmology*, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*. 5^a ed, Geneva, International Agency for Research on Cancer, 2017.

XIONG, H.; CHENG, J.; JIANG, S.; WEN, J. et al. The antitumor effect of resveratrol on nasopharyngeal carcinoma cells. *Frontiers In Bioscience*, v. 24, p. 961-970, 2019.

XU, J.; LIU, D.; NIU, H.; ZHU, G.; XU, Y.; YE, D.; LI, J.; ZHANG, Q. Resveratrol reverses Doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 36, n. 19, 2017.

XU, L.; YANG, X.; CAI, J. et al. Resveratrol attenuates radiation-induced salivary gland dysfunction in mice. *Laryngoscope*, v. 123, n. 11, p.23-29, 2013.

ZHANG J., CHEN J., YANG J., XU C.-W., PU P., DING J.-W., JIANG H. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress Induced by Balloon Injury in the Rat Carotid Artery Through Actions on the ERK1/2 and NF-Kappa B Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013.

ZHANG, S.-Z.; XIE, L.; SHANG, Z.-J. Burden of Oral Cancer on the 10 Most Populous Countries from 1990 to 2019: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2019. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 875, 2022.

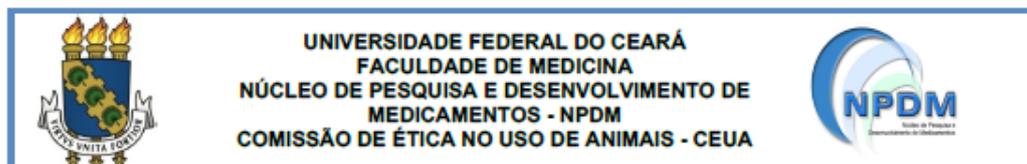
ZHAO, Y. et al. Stat3 is involved in the motility, metastasis and prognosis in lingual squamous cell carcinoma. *Cell Biochemistry and Function*, v. 30, n. 4, p. 340–346, 2012.

ZHUANG, Y. et al. Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier

Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1–14, 2019.

ZIGMUNDO, G. C. O.; SCHUCH, L. F.; et al. 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) induced oral carcinogenesis: A systematic literature review. *Pathology – Research and Practice*, v. 236, 2022.

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS –
CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NA CARCINOGENESE ORAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO EM CAMUNDONGOS " registrada com o protocolo 01090122-0, sob a responsabilidade de **Ana Paula Negreiros Nunes Alves e Amanda de Oliveira Freitas**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 17 /03/ 2022.

We hereby certify that the project entitled " **EVALUATION OF THE EFFECT OF RESVERATROL ON ORAL CARCINOGENESIS INDUCED BY 4-NITROQUINOLINE 1-OXIDE IN MICE**" identified by the protocol number 01090122-0, and conducted by **Ana Paula Negreiros Nunes Alves and Amanda de Oliveira Freitas**, which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 03 / 17 / 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 18/03/2022 Fim: 10/02/2023
Espécie	Camundongo heterogênico
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	60
Peso	30 gramas
Idade	06-08 semanas
Sexo	Machos
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 17 de março de 2022

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará