

JULIANA SANTOS DE CARVALHO MONTEIRO

**EFEITOS DO IMIQUIMODE E DO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE ($\lambda 660\text{nm}$) NO CÂNCER QUIMICAMENTE
INDUZIDO EM MUCOSA ORAL DE HAMSTERS**



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**Área de concentração:
Laser em Odontologia**

**SALVADOR
2010**

JULIANA SANTOS DE CARVALHO MONTEIRO

**EFEITOS DO IMIQUIMODE E DO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE ($\lambda 660\text{nm}$) NO CÂNCER QUIMICAMENTE
INDUZIDO EM MUCOSA ORAL DE HAMSTERS**

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Odontologia com Área de Concentração em Laser em Odontologia.

Orientadores: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro

JULIANA SANTOS DE CARVALHO MONTEIRO

**EFEITOS DO IMIQUIMODE E DO LASER EM BAIXA
INTENSIDADE (λ 660nm) NO CÂNCER QUIMICAMENTE
INDUZIDO EM MUCOSA ORAL DE HAMSTERS**

Salvador, 05/08/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos - Orientador - UFBA

Prof. Dr. Aldo Brugnera Júnior - Membro - UNICASTELO

Prof^a. Dr^a. Aparecida Maria Cordeiro Marques - Membro - UFBA

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro - Membro - UFPE

**Prof^a. Dr^a. Fátima Antônia Aparecida Zanin - Membro – INSTITUTO
BRUGNERA E ZANIN**

DEDICATÓRIA

A **Deus** que torna possível esses bons momentos na minha vida,
me protegendo em todo meu caminho.

Aos meus pais **Jorge** e **Marise** pelo amor incondicional e total incentivo às
minhas escolhas, e à minha irmã **Adriana**, minha fortaleza.

Ao meu amor **Marcus**, presente em todos os momentos, que me conforta e me
incentiva a seguir sempre adiante. Obrigada por fazer parte da minha vida
e da minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Jean Nunes dos Santos**, um agradecimento especial por acreditar em mim e pela oportunidade de aprender com os seus ensinamentos, fundamentais para o meu crescimento profissional.

Ao meu mestre Prof. Dr. **Antônio Luiz Barbosa Pinheiro**, admiro sua constante dedicação e disponibilidade à pesquisa. Obrigada por me guiar à ciência.

Ao meu primo **Rafael Carneiro Santos**, agradeço por me colocar no caminho da Odontologia.

À Prof^a.Dr^a. **Aparecida Maria Cordeiro Marques**, sua presença torna os nossos dias mais alegres.

À amiga **Susana Sampaio**, minha dupla perfeita, obrigada por dividir comigo as alegrias e os desabafos dessa jornada.

Aos meus colegas, **Gilberth Aciole, Fábio Colombo, Máira Costa Lino, Edival Magalhães, Alberto Valença, e Maria do Rosário Freire** por conhecê-los e pelos momentos únicos que passamos juntos.

Às amigas pós-doutorandas **Carol Carvalho, Nicole Ribeiro, Priscila Chagas** e **Ana Paula Cavalcanti**, pela grande ajuda, deixando nosso caminho mais fácil.

Às veterinárias, **Prof^a. Maria das Graças Pinto, Elisabeth Machado** e **Namá Silva** pela importante ajuda na execução prática do experimento.

Aos estagiários do Centro de Laser da FOUFBA pela convivência, e especialmente **Augusto Cardoso, Fernando Presídio, João Reis Júnior** e **Thaís Ramos**, pela ajuda direta no meu projeto.

À Prof^a.Dr^a. **Suzana C. Orsini Machado de Sousa** e Sr^a. **Elisa (FOUSP)** que contribuíram para realização da imunoistoquímica.

À Prof^a. Dr^a. **Clarissa Gurgel**, que com seus conhecimentos tanto me ajudou na análise estatística e na imunoistoquímica.

Às Sr^{as}. **Maria de Lourdes Santos** e **Miriam Moraes**, pela execução laboratorial.

Às secretárias **Sheila Miguez** e **Sueli Paixão**, pelo apoio administrativo.

A todos os Professores do Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia UFBA-UFPB, que colaboraram na construção dos conhecimentos necessários para a minha formação.

À **Faculdade de Odontologia da UFBA** e todos os seus funcionários pelo apoio e colaboração e ao **CNPq** pelo importante incentivo à pesquisa e pela concessão da Bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Carcinogênese química.....	18
2.2 Imiquimode.....	20
2.3 Imiquimode: Mecanismo de ação.....	22
2.4 Células dendríticas.....	26
2.5 Fototerapia Laser.....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Respaldo ético da pesquisa.....	36
4.2 Caracterização e manipulação da amostra.....	36
4.3 Organização dos grupos.....	37
4.4 Indução do câncer.....	37
4.5 Tratamentos.....	41
4.6 Caracterização do aspecto clínico.....	45
4.7 Preparo das amostras.....	45
4.8 Metodologia para gradação histológica.....	47
4.9 Exame imunoistoquímico.....	49

4.10 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Aspectos clínicos.....	51
5.2 Resultados histológicos.....	53
5.3 Resultados imunoistoquímicos.....	59
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNCIDE A – Protocolo utilizado na imunoistoquímica.....	94
ANEXO A – Certificado de aprovação no Comitê de ética em experimentação animal.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
AOM	Azoximetano
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Bcl-2	Gene anti-apoptótico; o nome deriva do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
CD40	Proteína coestimulatória 40
CD80	Proteína coestimulatória 80
CD86	Proteína coestimulatória 86
CD1a	<i>Cluster</i> de diferenciação 1a, glicoproteína de membrana das células de langerhans
CD8	<i>Cluster</i> de diferenciação 8, glicoproteína de superfície dos linfócitos T
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4, glicoproteína de superfície dos linfócitos T
CEEA	Comissão de ética em experimentação animal
CEC	Carcinoma escamocelular
CW	Emissão contínua
DAB	Diaminobenzidina
DEN	Dietilnitrosamino
DMBA	9,10-Dimetil-1,2-Benzantraceno
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
GM-CSF	Fator estimulador de colônias para macrófagos granulócitos
HeLa	Células de câncer cervical humano
He-Ne	Hélio-Neônio
H.Ep.2	Linhagem de células tumorais de carcinoma laríngeo humano
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IFN- α	Interferon- <i>alpha</i>
IFN- γ	Interferon- <i>gamma</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
KB	Cultura de células do carcinoma epidermóide de boca
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
MHC-I	Molécula do complexo maior de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Molécula do complexo maior de histocompatibilidade de classe II
μm	Micrômetro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
S-100	Família de proteínas antigênicas celulares
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento- <i>beta</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
TLR's	Receptores <i>Toll Like</i>
TLR-7	Receptor <i>toll like</i> 7
TLR-8	Receptor <i>toll like</i> 8
™	Marca registrada, do inglês <i>trademark</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- <i>alpha</i>
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral- <i>beta</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Φ	Diâmetro do spot

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos imunológicos de ação do imunomodulador imiquimode. O contato dessa substância com os receptores TLR-7 nas células dendríticas estimula a produção de citocinas. Algumas delas estimulam ação antitumoral com IFN- α . A ativação da célula dendrítica permite a ativação linfocitária no linfonodo regional e a subsequente produção de linfócitos, principalmente T CD8 antitumorais (LIMA, 2007)	25
Figura 2	Aparato de contenção animal (MONTEIRO, 2010).	40
Figura 3	Elásticos presos aos incisivos superiores e inferiores (MONTEIRO, 2010).	40
Figura 4	Dispositivo para escarificação da mucosa oral (MONTEIRO, 2010).	40
Figura 5	Carcinógeno DMBA (MONTEIRO, 2010).	40
Figura 6	Aldara [®] Imiquimode creme 5% (MONTEIRO, 2010).	43
Figura 7	Aplicação do imiquimode com espátula plástica descartável (MONTEIRO, 2010).	43
Figura 8	Aparelho diodo (AsGaAl) (Kondortech [®]) (MONTEIRO, 2010).	43
Figura 9	Irradiação com laser de baixa intensidade (λ 660nm) (MONTEIRO, 2010).	43
Figura 10	Potenciômetro Thorlabs PM30 (MONTEIRO, 2010).	43
Figura 11	Aspecto clínico da bolsa jugal íntegra (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 12	Necrose do fundo da bolsa jugal (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 13	Redução no tamanho da bolsa jugal após necrose (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 14	Múltiplas lesões exofíticas papilomatosas após carcinogênese química com DMBA (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 15	Aspecto clínico após o tratamento com imiquimode (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 16	Aspecto clínico após tratamento com imiquimode associado ao laser (MONTEIRO, 2010).	52
Figura 17	Fotomicrografia mostrando o aspecto histológico do CEC bem diferenciado (microinvasivo) (MONTEIRO, 2010).	55
Figura 18	Fotomicrografia mostrando o aspecto histológico do CEC bem diferenciado (MONTEIRO, 2010).	55
Figura 19	Aspecto histológico do CEC moderadamente diferenciado (MONTEIRO, 2010).	56
Figura 20	Aspecto histológico do CEC pouco diferenciado (MONTEIRO, 2010).	56
Figura 21	Detalhe em maior aumento do CEC pouco diferenciado após tratamento com laser (MONTEIRO, 2010).	57
Figura 22	Fotomicrografia mostrando o aspecto histológico da displasia discreta após o tratamento com imiquimode (MONTEIRO, 2010).	57
Figura 23	Percentual dos tumores malignos por grupo experimental (MONTEIRO, 2010).	58

Figura 24	Fotomicrografia mostrando a presença de células dendríticas S-100+ na mucosa normal da bolsa jugal do hamster (MONTEIRO, 2010).	61
Figura 25	Displasia discreta com a presença de células dendríticas S-100+ no formato fusiforme e dendrítico propriamente dito após tratamento com imiquimode (MONTEIRO, 2010).	61
Figura 26	Fotomicrografia mostrando a presença de células dendríticas S-100+ em CEC bem diferenciado (microinvasivo) após tratamento com imiquimode (MONTEIRO, 2010).	62
Figura 27	Fotomicrografia do CEC bem diferenciado com ausência de células dendríticas S-100+ após tratamento com laser ($\lambda 660\text{nm}$) (MONTEIRO, 2010).	62
Figura 28	Fotomicrografia do CEC pouco diferenciado com ausência de células dendríticas imunomarcadas após tratamento com laser ($\lambda 660\text{nm}$) (MONTEIRO, 2010).	63
Figura 29	Detalhe em maior aumento do CEC pouco diferenciado evidenciando a ausência de células dendríticas imunomarcadas (MONTEIRO, 2010).	63
Figura 30	Resultado da análise estatística pelo teste de Mann Whitney, para o grupo Imiquimode (MONTEIRO, 2010)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos Grupos Experimentais (MONTEIRO, 2010).	37
Tabela 2	Aparelho e parâmetros utilizados na fototerapia laser (MONTEIRO, 2010).	42
Tabela 3	Clone, especificidade, diluição, tratamento de recuperação antigênica, e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado (MONTEIRO, 2010).	46
Tabela 4	Critério arquitetônico e citológico usado para a graduação da displasia epitelial oral na classificação da OMS (GALEN <i>et al.</i> , 2005).	47
Tabela 5	Número e percentual de animais por grupo de estudo de acordo com as graduações histológicas dos carcinomas e displasias (MONTEIRO, 2010).	53
Tabela 6	Graduação histológica, infiltrado inflamatório e número médio de células S-100+ no estroma dos tumores, nas displasias dos grupos experimentais e na mucosa normal íntegra da bolsa jugal do hamster, e o desvio padrão (MONTEIRO, 2010).	64

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do imiquimode e do laser ($\lambda 660\text{nm}$) no câncer quimicamente induzido em mucosa oral de hamsters sírios dourados. Foram utilizados 25 hamsters nos quais as lesões de câncer foram quimicamente induzidas na mucosa jugal direita através de aplicações do carcinógeno DMBA (9,10-Dimetil-1,2-Benzantraceno) três vezes por semana, durante oito semanas. A distribuição dos animais foi feita aleatoriamente em cinco grupos de estudo, com cinco animais em cada (1) Controle I (sacrifício 48h após a carcinogênese química), (2) Controle II (sacrifício quatro semanas após a carcinogênese química), (3) Laser, (4) Imiquimode, (5) Imiquimode e laser. A terapia com imiquimode foi realizada três vezes semanais durante o período de quatro semanas e a fototerapia laser, a cada 48 horas pelo mesmo período, utilizando um Laser diodo (Bio Wave, Kondortech, São Paulo, SP, Brasil, $\lambda 660\text{nm}$, 50mW, CW, 95 J/cm^2 , 6,65J, $714,2\text{mW/cm}^2$, 133s, $\phi 3\text{mm}$, $0,07\text{cm}^2$). As amostras foram processadas usando coloração de rotina e imunoistoquímica para proteína S-100 visando à detecção de células dendríticas. Os resultados histológicos e imunoistoquímicos dos grupos controle e o grupo com laser resultaram em 100% de tumores malignos e ausência de células dendríticas S-100+ no estroma tumoral. O grupo tratado com imiquimode demonstrou 60% de animais sem malignidade, e presença de células dendríticas S-100+ tanto no estroma dos tumores, quanto nas displasias. E o grupo tratado com imiquimode e laser apresentou 40% de tumores malignos e células dendríticas S-100+ pouquíssimas ou ausentes. O tratamento com Imiquimode demonstrou a presença de lesões displásicas discretas, bem como um aumento do número de células dendríticas S-100+ nas áreas de lesão, e isto poderia significar uma maior ação do sistema imune no combate ao tumor, no entanto sua associação com o laser precisa ser melhor investigada.

Palavras-chave: Lasers; Câncer de Boca; 9,10-Dimetil-1,2-Benzantraceno; Imiquimode.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of imiquimod and laser phototherapy ($\lambda 660\text{nm}$) in chemo-induced oral cancer of Syrian golden hamsters. The cancer lesions were chemo-induced on the right cheek pouch of 25 Syrian golden hamsters by using carcinogen DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene) three times a week for eight weeks. The distribution of animals was randomly assigned to five study groups with five animals each (1) Control I (sacrifice 48h after chemical carcinogenesis), (2) Control II (sacrifice four weeks after chemical carcinogenesis), (3) Laser (4) Imiquimod, (5) Imiquimod and laser. Treatment with imiquimod was performed three times weekly during four weeks and laser phototherapy, every 48 hours for the same period using a laser diode (Bio Wave Kondortech, São Paulo, Brazil, $\lambda 660\text{nm}$, 50mW, CW, $95\text{J}/\text{cm}^2$, $6,65\text{J}$, $714,2\text{mW}/\text{cm}^2$, 133s, ϕ 3mm, $0,07\text{cm}^2$). The samples were processed using routine staining and immunohistochemistry for S-100 protein to determine the presence of dendritic cells. Histological and immunohistochemical findings of control groups and laser group resulted in 100% of malignant tumors and absence of dendritic S-100 + in the tumor stroma. The imiquimod group showed 60% of animals without malignancy, and presence of dendritic S-100 + in both stroma tumors and dysplasia. And the group treated with imiquimod and laser showed 40% of malignant tumors and very few or absent dendritic cells S-100 +. Treatment with imiquimod showed discrete dysplastic lesions, which increases the number of dendritic S-100 + in the damaged area, and this could mean a greater share of the immune system to fight tumors, however its association with the laser should be further investigated.

Keywords: Lasers; Oral cancer; 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene; Imiquimod.

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer de boca engloba um conjunto de neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal em suas mais variadas etiologias e aspectos histopatológicos. Dentre estas, destaca-se o carcinoma de células escamosas, que responde por 90% a 95% dos casos de câncer na boca (CARVALHO *et al.*, 2001; DEDIVITIS *et al.*, 2004). Este carcinoma apresenta um comportamento agressivo, com alta capacidade de proliferação, de invasividade e para gerar metástase (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os modelos de carcinogênese quimicamente induzidos em ratos são muito usados para estudos da biologia do câncer e para o desenvolvimento e evolução de estratégias de prevenção (SILVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2004; BOLANHO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006; FARWELL *et al.*, 2010), sendo aqueles induzidos em hamsters sob a ação do DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) os que apresentam muitas similaridades com o desenvolvimento do câncer oral humano (SCHWARTZ *et al.*, 2000).

Aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1997 para tratamento de verrugas externas genitais e perianais e, em 2004 para o tratamento de queratose actínica e carcinomas basocelulares, o imiquimode é uma droga modificadora da resposta imune, conhecida por sua potente atividade antitumoral (NAVI e HUNTLEY, 2004; JOBANPUTRA *et al.*, 2006).

O mecanismo antitumoral do imiquimode é baseado primariamente na ativação do sistema imune inato, pelo qual as células dendríticas cutâneas parecem ser as principais responsáveis (STANLEY, 2002). Além disso, induz

citocinas inflamatórias e moduladoras da resposta imune, agindo por restabelecimento do sistema de apoptose das células tumorais (SCHÖN e SCHÖN, 2004).

A luz laser em baixa intensidade modula a função imune celular *in vitro*, contudo, pouco é conhecido sobre os efeitos da radiação laser na atividade celular imune em modelo animal (NOVOSELOVA *et al.*, 2006a; MAS, 2010).

Os incrementos de ATP (adenosina trifosfato) mitocondrial, que são produzidos após a irradiação laser, favorecem um grande número de reações que intervêm no metabolismo celular (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). No entanto, a estimulação ou inibição das funções dos fotorreceptores, que fazem parte da cadeia respiratória celular, determina a magnitude da proliferação das células (SCHINDL *et al.*, 2000; CARNEVALLI *et al.*, 2003).

O presente estudo propõe-se avaliar histologicamente o efeito do imiquimode e do laser em baixa intensidade ($\lambda 660\text{nm}$) em lesões de câncer quimicamente induzidas por DMBA em mucosa oral de hamsters, bem como a participação de células dendríticas S-100 positivas nestes casos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinogênese química

A carcinogênese química é um processo dinâmico, caracterizado por múltiplas etapas divididas didaticamente em: Iniciação, Promoção e Progressão (ALMEIDA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Estágio de iniciação: O dano no DNA causado pela exposição a uma substância química mutagênica, ou iniciadora é o evento que inicia a carcinogênese química (SANTELLA *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2008). Porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Estágio de promoção: Em seguida a exposição de uma célula a um mutagênico ou um iniciador, a carcinogênese pode ser potencializada pela exposição a promotores, que estimulam a proliferação das células mutadas (KUMAR *et al.*, 2008). É reversível, pois a suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo, e a regressão da proliferação celular pode ocorrer, provavelmente por apoptose (GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001).

Estágio de progressão: Caracteriza-se pela multiplicação descontrolada ocorrendo transformação maligna, é um processo irreversível. A proliferação celular é independente da presença do estímulo e caracterizada pela instabilidade genética, crescimento mais rápido, invasão, metástases, e as alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas características das células (LUTZ, 2000, GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001).

Os carcinógenos químicos 1 metil-1-nitrosurea (MNU), 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), dietilnitrosamino (DEN) ou azoximetano (AOM) têm sido predominantemente usados na investigação de uma variedade de novos agentes quimiopreventivos do câncer (MACEJOVÁ e BRATKO, 2001).

O modelo de carcinogênese química em bolsa jugal do hamster sírio dourado é um dos modelos mais bem caracterizados para carcinomas de células escamosas, o qual é comparável aos eventos envolvidos no desenvolvimento de lesões pré-malignas e malignas humanas (GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 2004). O uso do carcinógeno DMBA pode iniciar e promover o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em língua e mucosa bucal de hamsters sírios dourados (YU *et al.*, 2009; BERTA *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm sido realizados para descobrir novas técnicas para detecção e o diagnóstico precoce do câncer utilizando esse modelo. Estudos sugerem que a espectroscopia fluorescente induzida por laser pode ser uma técnica não invasiva valiosa para o diagnóstico precoce do câncer da cabeça e pescoço, apresentando uma alta sensibilidade e especificidade (EBIHARA *et al.*, 2003 e SILVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2004). Outros têm buscado novos tratamentos e prevenção para o câncer, como por exemplo, os efeitos inibitórios do chá verde e curcumina, relacionados à supressão da proliferação celular, indução de apoptose e inibição da angiogênese (LI *et al.*, 2002), os efeitos antitumor da genistein, uma isoflavona presente na soja, (YANG *et al.*, 2006) e num recente estudo foi avaliada a eficácia *in vivo* do Glucarato de Cálcio na inibição da carcinogênese (LAJOLO *et al.*, 2010).

2.2 Imiquimode

A terapia imunológica moderna envolve o uso de imunomoduladores, que são drogas que podem exacerbar ou reduzir a resposta imune (LIMA, 2004).

O imiquimode (1-(2-metilpropil)-1-H-imidazol[4,5-c]quinolina-amina) é um novo composto sintético membro da família imidazoquinolona, que tem propriedades modificadoras e estimuladoras tópicas da resposta imune, cujo peso molecular é 240,3 (NAVI e HUNTLEY, 2004; WIWANITKIT, 2004). É capaz de ativar as células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos e células dendríticas), resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, algumas das citocinas também reforçam o sistema imune adquirido, incluindo a ativação dos linfócitos T e outras respostas imunológicas que ajudam a controlar os vírus, tumores e parasitas intracelulares (STANLEY, 2002).

É comercializado sob a forma de um creme branco ou ligeiramente amarelo a 5% (Aldara[®] – 3M Health Care Limited, Loughborough, Leicestershire, Reino Unido) e cada saqueta contém 12,5 mg de imiquimode em 250 mg de creme. Os principais excipientes são ácido isoesteárico, álcool benzílico, álcool cetílico, álcool estearílico, vaselina branca, polissorbato 60, estearato de sorbitano, glicerol, para-hidroxibenzoato de metilo (E218), para-hidroxibenzoato de propilo (E216), goma xantana, água purificada (3M PHARMACEUTICALS, 1997).

Tem como indicações terapêuticas o tratamento tópico de verrugas genitais externas e perianais, pequenos carcinomas superficiais basocelulares,

queratoses actínicas não-hiperqueratóticas e não-hipertróficas em adultos imunocompetentes. A posologia e modo de administração diferem de acordo com a indicação clínica, devendo ser evitado o contato com os olhos, lábios e narinas (3M PHARMACEUTICALS, 1997).

Menos de 0,9% de uma dose única topicamente aplicada de imiquimode é absorvida através da pele humana e a pequena quantidade do fármaco que é absorvida para a circulação sistêmica é imediatamente excretada por via urinária e fecal (3M PHARMACEUTICALS, 1997). Por causa da administração local, efeitos colaterais sistêmicos são raros, e reações locais ocorrem com maior frequência incluindo coceira (16-67%), ardor (6-35%) e dor (3-35%) (LOVE, BERNHARD e BORDEAUX, 2009). Embora apenas uma pequena quantidade de droga deva atingir a circulação sistêmica, efeitos colaterais sistêmicos incomuns têm incluído sintomas de gripe e fadiga (WOOTEN, 2005).

O imiquimode creme 5% foi utilizado no tratamento de pacientes com carcinomas basocelulares perioculares, parecendo seguro para este uso, desde que nenhum dano ao olho ou perda permanente da acuidade visual foi observado, mesmo quando a droga foi colocada repetidamente em contato com a mucosa conjuntiva (CHOONTANOM *et al.*, 2007; CARNEIRO, MACÊDO e MATAYOSH, 2010).

Até o momento existem poucos estudos que relatam aplicações do imiquimode em mucosa oral. É relatado o caso de uma paciente com histórico de recorrências de melanoma intraepitelial da cavidade oral que recebeu aplicações de imiquimode creme 5% e após 13 meses de acompanhamento não teve evidências de recidiva local. Então, o tratamento com imiquimode

tópico poderia ser uma alternativa em pacientes com lesões melanocíticas intraepiteliais irressectáveis porque é bem tolerado e pode aplicado além da área do tumor clinicamente suspeita. Além disso, o imiquimode poderia ser uma importante alternativa em pacientes com tumores melanocíticos de mucosa superficial, os quais não podem ser submetidos à ressecção completa. (SPIETH *et al.*, 2006). Melanoma in situ em outros sítios mucosos além da mucosa oral, por exemplo, vagina e vulva, podem também se beneficiar do tratamento tópico com esta droga (LONSDALE-ECCLES *et al.*, 2006).

O creme imiquimode também foi utilizado em mucosa oral como tratamento de três casos de hiperplasia epitelial focal (doença de Heck), que foram resistentes a outros tipos de tratamento, mas que responderam totalmente ao imiquimode tópico em quatro meses de tratamento. Ao final dos tratamentos as lesões desapareceram e nenhuma recorrência foi observada no período de um ano, então o imiquimode pode ser uma opção alternativa de tratamento, segura e não invasiva para os casos pediátricos de hiperplasia epitelial focal (YASAR *et al.*, 2009). Em outro estudo dois irmãos com hiperplasia epitelial focal também foram tratados com imiquimode, apresentando excelente resposta (PONTES, SERRÃO e FIADEIRO, 2010).

2.3 Imiquimode: Mecanismo de ação

Duas ações são reconhecidas para esta droga, a pró-apoptótica e a imunomoduladora (MACÊDO, CARNEIRO e MATAYOSHI, 2007).

Existem três principais hipóteses para explicar o mecanismo molecular pelo qual o imiquimode induziria a apoptose das células tumorais. Na primeira,

atuaria diretamente nos receptores de morte celular ligado a membrana, iniciando a cascata que levaria a apoptose. Na segunda, penetraria a membrana celular atuando mais à frente na cascata de eventos que leva a apoptose, sendo independente dos receptores. E na terceira, também independe dos receptores, porém agora atuaria em uma via intrínseca dependente da liberação de citocromo C mitocondrial (SCHÖN e SCHÖN, 2004).

A atividade pró-apoptótica do imiquimode ocorre através da modulação da família do Bcl-2, que regulam a permeabilidade da membrana externa mitocondrial. As células tumorais se tornam mais susceptíveis a apoptose através da redução de expressão do Bcl-2 após tratamento com imiquimode creme 5% (VIDAL, MATIAS-GUIU e ALOMAR, 2004; SCHÖN e SCHÖN, 2007; DE GIORGI, *et al.*, 2009).

Quanto à ação imunomoduladora, este composto é capaz de atuar se ligando a receptores específicos nas células dendríticas. Dessa interação resulta a transcrição e liberação de múltiplas citocinas pró-inflamatórias locais. Esse tipo de resposta imune inata é suficiente para induzir também uma resposta imune celular tumor-específica. A atividade antitumoral do imiquimode é baseada primariamente na ativação do sistema imune inato pelo qual células dendríticas cutâneas parecem ser as células primariamente responsáveis. Estas células respondem as mais baixas concentrações do imiquimode do que muitos outros tipos celulares (SCHÖN e SCHÖN, 2007; MACÊDO, CARNEIRO e MATAYOSHI, 2007).

A resposta imune inata depende dos receptores específicos conhecidos como “*Toll Like Receptor’s*” ou TLR’s (MACÊDO, CARNEIRO e MATAYOSHI, 2007). Tem sido demonstrado que os TLR’s são a base molecular da atividade pró-inflamatória do imiquimode, geralmente o efeito biológico é primariamente exercido pelos TLR-7 e TLR-8 (SCHÖN e SCHÖN, 2007).

A ativação do TLR-7 leva ao aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40; CD80 e CD86), assim como do nível de MHC-I e MHC-II (moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo I e tipo II, respectivamente). Essas quando ligadas a peptídeos do antígeno participam na ativação da célula T pela célula dendrítica madura. Tal fato sugere que uma importante ação do imiquimode é o aumento da eficiência na apresentação de antígeno pela célula dendrítica (HURWITIZ, PINCUS e KUPPER, 2003).

Outro possível mecanismo imune da ação do imiquimode é sua capacidade de modular a função das células de Langerhans, estimulando a migração para os linfonodos regionais onde elas promovem uma resposta específica das células T (FESTA NETO, 2002; SCHÖN e SCHÖN, 2007). O tratamento com imiquimode induz diminuição no número de células de Langerhans CD1a+ na epiderme e aumenta dentro do tumor (DE GIORGI *et al.*, 2009).

O contato do imiquimode com os TLR-7 nas células dendríticas estimula a produção de citocinas (**Fig. 1**) (LIMA, 2007). A depender dos tipos de citocinas liberadas pelas células dendríticas pode-se direcionar os linfócitos T *helper* na definição da resposta imune Th1 (IFN- α , TNF- α e TNF- β) induzindo inflamação, ativação de macrófagos e imunidade celular ou Th2 (IL-4, IL-5, IL-

10 e IL-13) induzindo resposta humoral, ativação de eosinófilos e geralmente inibindo a imunidade celular. Assim a estimulação de receptores TLR-7 serve de ponte ou ligação entre a resposta imune inata e a adquirida (celular), de um lado a inflamação local produzida pelas citocinas e do outro a migração e apresentação de antígenos as células T (HURWITIZ, PINCUS e KUPPER, 2003).

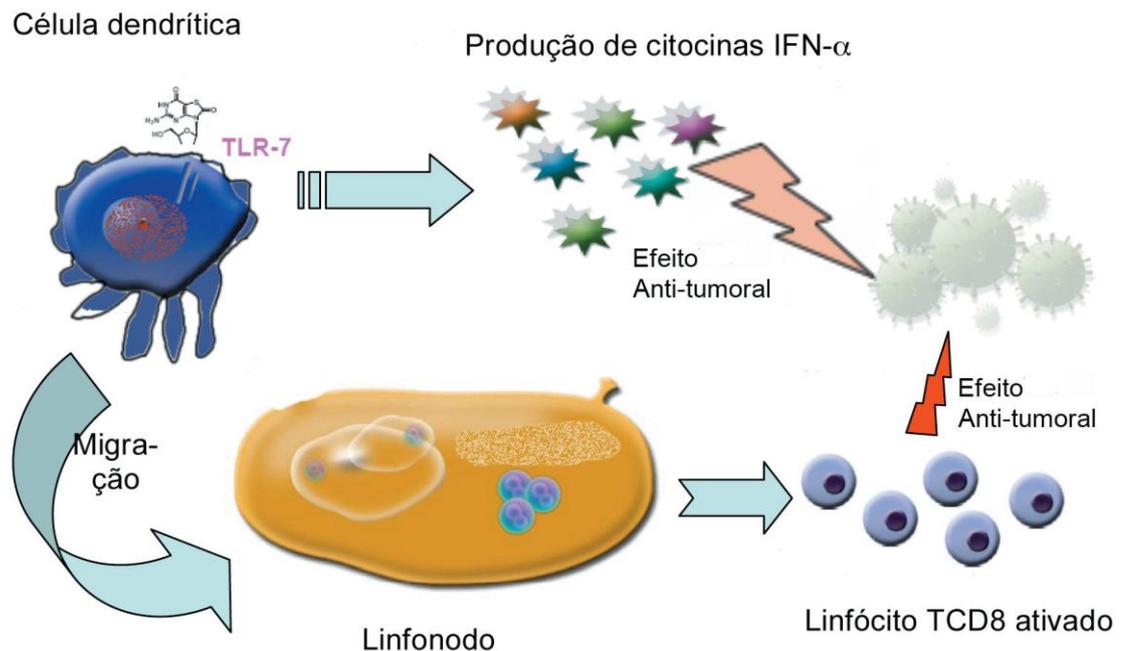


Fig. 1: Mecanismos imunológicos de ação do imunomodulador imiquimode. O contato dessa substância com os receptores TLR-7 nas células dendríticas estimula a produção de citocinas. Algumas delas estimulam ação antitumoral com IFN- α . A ativação da célula dendrítica permite a ativação linfocitária no linfonodo regional e a subsequente produção de linfócitos, principalmente T CD8 antitumorais (LIMA, 2007)

Em modelos animais, o imiquimode também atua estimulando a atividade das células *natural killer*, bem como na proliferação diferenciação dos linfócitos B (MILLER *et al.*, 1999) e na produção de anticorpos (HENGGE e RUZICKA, 2004).

2.4 Células dendríticas

Na resposta imunológica às células tumorais, bem como na imunoterapia do câncer, as células dendríticas são um dos principais alvos de estimulação (LESIMPLE *et al.*, 2006; LIU, BLACK e YU, 2006).

As células dendríticas compreendem três subtipos, dois deles, tais como, células de Langerhans e células dendríticas intersticiais, são derivados da linhagem mielóide e o terceiro subtipo, derivado da linhagem linfóide, é conhecido como célula dendrítica de origem linfóide (STEINMAN, 2003).

Existem três estágios de maturação: células precursoras, que circulam pelos vasos sanguíneos e linfáticos, células dendríticas imaturas que residem em diversos tecidos capturando antígenos e as maduras, residentes temporárias dos órgãos linfóides secundários (REINHARD *et al.*, 2002).

Os extensivos prolongamentos citoplasmáticos são responsáveis pela sua capacidade de interação celular. As etapas de crescimento e diferenciação das células dendríticas estão diretamente relacionadas com a sua migração e atividade funcional (HART, 1997).

Após a captura antigênica, as células dendríticas imaturas sofrem uma série de alterações morfológicas, fenotípicas e funcionais que resulta na transição de uma célula que captura antígenos em uma célula apresentadora de antígenos propriamente dita. A maturação é um processo contínuo que se inicia nos tecidos periféricos e se completa durante a interação dessas células com os linfócitos T nos órgãos linfóides (KELLER, 2001).

A maturação das células dendríticas é estimulada por produtos bacterianos antigênicos, como os lipopolissacarídeos e citocinas pró-

inflamatórias, incluindo o TNF- α , GM-CSF, IL-1, IL-3 e IL-6 (MCLELLAN e KAMPGEN, 2000; KELLER, 2001).

As células de Langerhans são células dendríticas derivadas da medula óssea que representam as principais apresentadoras de antígeno da pele, conferindo a resposta imune cutânea. A presença de tumores inibe sua migração, impedindo que os linfócitos T promovam regressão das células neoplásicas. As células de Langerhans ativadas são estáveis, resistentes aos fatores supressores relacionados ao tumor e mostram capacidade aumentada de induzir resposta imune (NADAL *et al.*, 2006).

A população de células dendríticas reduz com a idade, com alguns agentes farmacológicos, incluindo corticosteróides, ciclosporina e retinóides, com a radiação ultravioleta, e a maioria das drogas imunossupressoras diminui o número e a função dessas células, predispondo ao aparecimento do câncer (NADAL *et al.*, 2006).

A regressão dos tumores ocorre quando linfócitos T (CD8+) reconhecem o complexo peptídeo – MHC-I na superfície do tumor. Para que isso ocorra, as células dendríticas precisam migrar até o tumor, capturar antígenos tumorais e migrar aos órgãos linfóides secundários, gerando células T (CD8+) citotóxicas efectoras contra antígenos associados ao tumor. Com sua grande capacidade de captura, as células dendríticas podem capturar os antígenos tumorais e promover a apresentação destes em suas superfícies, através de MHC-II para as células T (CD4+), causando proliferação de células T (CD4+) específicas iniciando uma resposta imune contra tumores. Entretanto, em algumas pessoas este processo de apresentação acaba não ocorrendo ou

mesmo a apresentação é deficitária, resultando no subsequente desenvolvimento do tumor (BANCHEREAU *et al.*, 2001; MARTI, 2008).

O impacto das células dendríticas sobre o sistema imune não está limitado apenas à apresentação de antígenos aos linfócitos T. Tem sido relatada sua atuação na promoção da diferenciação de plasmócitos a partir de linfócitos B (HOLÍKOVÁ *et al.*, 2001).

Os marcadores que melhor identificam as células de Langerhans são a molécula de superfície glicoprotéica CD1, em destaque a CD1a que parece ser exclusiva das referidas células e seus precursores, e a proteína S-100, que identifica todos os tipos de células dendríticas maduras e imaturas, mas também outros tipos celulares (GUTKIN, 2009).

A administração de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas carregadas com os antígenos do tumor, é considerada agora uma das técnicas mais promissoras para a imunoterapia de cânceres específicos (LEE *et al.*, 2007).

O tratamento combinado da aplicação tópica do imiquimode e da injeção intratumoral de células dendríticas conduz à regressão significativa do melanoma, em contraste a erradicação parcial dos tumores com imiquimode ou células dendríticas sozinhos. Sendo a terapia da combinação uma estratégia potente para o tratamento do melanoma (LEE *et al.*, 2007).

Um estudo foi realizado com 30 casos de carcinoma basocelular agressivos e 30 casos não agressivos para identificação da densidade de células dendríticas fator XIIIa+ ao redor desses carcinomas. Quando analisada a topografia do tumor os resultados demonstraram que a densidade de células

dendríticas foi maior, nos carcinomas basocelulares localizados na face do que em outras regiões. Um dos principais resultados foi a correlação negativa entre densidade de células dendríticas e tamanho do tumor nos não agressivos e agressivos. A densidade de células dendríticas no estroma imediatamente envolvendo o tumor e na área mais próxima da ressecção, na derme “normal” não mostrou significativa diferença entre os subtipos. Estimar a densidade de células dendríticas ao redor dos carcinomas basocelulares é de relevância clínica, uma vez que há indícios de que uma baixa densidade peritumoral de células dendríticas pode reduzir a eficácia da terapia imiquimode RYBKA *et al.*,2008).

Há provas de que a densidade de células dendríticas pré-tratamento pode afetar a eficácia de imiquimode em erradicar o câncer de pele, e diferenças da densidade de células dendríticas na proximidade dos tumores pode ser pelo menos em parte, responsável por este fenômeno (QUATRESOOZ e PIÉRARD, 2004).

2.5 Fototerapia laser

Para que a radiação laser exerça algum efeito sobre o organismo, é necessário que ela seja absorvida pelo mesmo, havendo interação dessa radiação com as estruturas moleculares e celulares dos tecidos vivos. (GENOVESE, 2007; PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). A interação do laser com os tecidos biológicos é dependente de vários fatores, tais como comprimento de onda, potência, quantidade de energia, frequência e duração dos pulsos, modo de entrega da luz, tempo de exposição, distância

focal, além das propriedades ópticas de cada tecido e sua capacidade de absorção (GENOVESE, 2007).

Os principais efeitos dos lasers em baixa intensidade são fotoquímicos. A absorção de fótons por biomoléculas intracelulares produz a estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas, permitindo a instalação de processos fisiológicos de natureza terapêutica, como ações analgésicas, antiinflamatórias e de bioestimulação tecidual (GENOVESE, 2007; PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010).

O laser em baixa intensidade tem ação principalmente nas membranas plasmáticas e organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, gerando aumento de ATP (adenosina trifosfato) e modificando o transporte iônico. Acredita-se existir fotorreceptores celulares sensíveis a determinados comprimentos de onda que ao absorverem fótons desencadeiam reações químicas intracelulares. O citocromo *a/a3* é um importante fotorreceptor, outro fotorreceptor sugerido é o NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato), a qual possui uma flavoproteína que pode absorver a luz (KARU, 1987; KARU, 1988).

Existem várias teorias para explicar a ação na célula, uma delas refere-se à formação de uma pequena quantidade de radicais livres de oxigênio. Esses radicais livres em grande quantidade são prejudiciais à célula, mas em pequena quantidade atuam como mensageiros na cascata de eventos que sucedem a irradiação, influenciando, por exemplo, a formação de ATP, que é a fonte de energia da célula (MIKAIL, 2009).

Os incrementos de ATP mitocondrial, que se produzem após irradiação laser, favorecem um grande número de reações que intervêm no metabolismo celular. Entre elas temos o incremento de adesão dos macrófagos e linfócitos (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010; MAS, 2010). Tem sido mostrado que a luz laser em baixa intensidade modula a função imune celular *in vitro*, contudo pouco é conhecido sobre os efeitos da radiação laser na atividade celular imune em modelo animal (NOVOSELOVA *et al.*, 2006a).

A estimulação ou inibição das funções dos fotorreceptores, que fazem parte da cadeia respiratória celular, determina a magnitude da proliferação das células. A dose de irradiação e a densidade de energia são os parâmetros mais importantes na fotobiomodulação. Se a dose for muito alta pode-se ter um resultado negativo, não estimulatório ou até mesmo inibitório (SCHINDL *et al.*, 2000; CARNEVALLI *et al.*, 2003).

A luz laser é uma luz polarizada, na qual as ondas vibram em apenas uma direção. Esta luz polarizada ativa as defesas celulares e humorais e aumentam a liberação de fatores de crescimento, citocinas e síntese de colágeno (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). Vários fatores são afetados pela fotobiomodulação laser, estes incluem TGF- β , PDGF, Ca²⁺, aumento na produção de ATP, redução nos níveis de prostaglandinas e melhora da permeabilidade da parede celular. Estes fatores não são só aumentados, são modulados de acordo com o estado oxidativo da célula (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010).

A terapia com laser em baixa intensidade pode ter um efeito maior sobre a proliferação de linfócitos e produção de citocinas (GULSOY, 2006). A

irradiação laser diodo pulsado (AsGa, λ 904nm, 6 kHz, 10 mW, 60') aumenta significativamente a produção de ATP em linfócitos (BENEDICENTI *et al.*, 2008).

Existe um efeito estimulatório da luz laser (He-Ne, λ 632,8nm, 127,32 mW/cm²) nos eritrócitos, que demonstram um rápido aumento da saturação de oxigênio da hemoglobina e um aumento da tensão de oxigênio no sangue, há também um efeito estimulatório na proliferação de linfócitos B e um ligeiro efeito sobre os linfócitos T (WASIK *et al.*, 2007). A luz laser atua sobre a imunidade celular, visto que produz uma ação imunomoduladora sobre linfócitos T e imunoestimulante em linfócitos B, potencializando a capacidade fagocitária de neutrófilos (HU *et al.*, 2007).

O efeito *in vitro* da luz laser em baixa potência (He-Ne, λ 632,8nm, 0,012J/cm², 0,2 mW/cm²) nos tempos de 5 e 30 segundos, na atividade funcional de macrófagos e linfócitos do baço induz o estímulo da atividade secretória das células com estimulação de IL-2 e óxido nítrico, bem como um aumento na atividade das células *natural killer* e o aumento na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-6. Enquanto que o prolongamento da exposição (60 e 180 segundos) induz principalmente imunossupressão (NOVOSELOVA *et al.*, 2006b).

Para estudar os possíveis efeitos da laserimunoterapia o laser (He-Ne, λ 632,8nm, 0.012J/cm², 0,2 mW/cm²) foi aplicado em uma área de projeção do timo ou um membro traseiro de ratos portadores de tumores sólidos, formados após injeção subcutânea de células do carcinoma de Ehrlich, demonstrando que a exposição crônica à luz laser tanto na projeção do timo, como num

membro traseiro, resultou na aceleração do crescimento do tumor. Pelo contrário, uma única exposição estimulou a imunidade antitumoral por vários dias (GLUSHKOV *et al.*, 2006)

A ação do laser na atividade proliferativa celular é um assunto controverso já que a luz laser estimula ou inibe a proliferação de células em culturas (PINHEIRO *et al.*, 2002). Apenas a proliferação da população de células de crescimento lento parece ser estimulada pela luz laser (MOGNATO *et al.*, 2004)

Duas linhagens de células de carcinoma foram irradiadas ($\lambda 805\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$, $50\text{mW}/\text{cm}^2$) resultando em diferentes respostas. Enquanto que o carcinoma de células uroteliais respondeu aumentando os índices mitóticos, a linhagem do carcinoma de células escamosas da mucosa gengival humana mostrou inibição da atividade proliferativa celular (SCHAFFER *et al.*, 1997). Os mesmos resultados foram obtidos com exposições a outros comprimentos de onda ($\lambda 630\text{nm}$ e $\lambda 635\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$, $50\text{mW}/\text{cm}^2$) (SROKA *et al.*, 1999).

A irradiação com luz laser He-Ne ($\lambda 632,8\text{nm}$, $5\text{mW}/\text{cm}^2$, 4 dias consecutivos) em uma linhagem celular do mieloma em ratos interfere com o ciclo celular e pode inibir a proliferação celular quando a irradiação é feita com doses de $8\text{J}/\text{cm}^2$ ou mais (OCAÑA-QUERO *et al.*, 1998).

A irradiação de células H.Ep.2 (linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano) por lasers diodo $\lambda 635\text{nm}$ e $\lambda 670\text{nm}$ (0,04 a $0,48\text{ J}/\text{cm}^2$, 5mW , CW, sete dias consecutivos) demonstrou que a luz laser $\lambda 635\text{nm}$ não exerce um efeito estimulativo significativo na proliferação das

células H.Ep.2 e que as culturas irradiadas com o laser $\lambda 670\text{nm}$ tiveram sua atividade proliferativa aumentada (PINHEIRO *et al.*, 2002)

A proliferação celular do hepatoma humano foi inibida após irradiação com laser diodo (AsGaAl, $\lambda 808\text{nm}$, 130 mW, CW) em diferentes intervalos de tempo, uma vez que o número de células e a expressão do PCNA foi reduzida. O efeito máximo foi obtido com 90 segundos de tempo de exposição referente à densidade de energia de $5,85\text{ J/cm}^2$ (LIU *et al.*, 2004).

O desenvolvimento do carcinoma de células escamosas através do modelo de indução química com DMBA torna possível buscar novos tratamentos para esta neoplasia (YU *et al.*, 2009; BERTA *et al.*, 2010). O creme imiquimode desempenha ação imunomoduladora com atividade antitumoral (JOBANPUTRA *et al.*, 2006; SCHÖN e SCHÖN, 2007), e a escassez de estudos a respeito da sua utilização em carcinomas de células escamosas da cavidade oral, torna este estudo relevante. Embora a utilização do laser em baixa intensidade apresente respostas estimulatórias ou inibitórias a depender dos parâmetros do aparelho e da célula ou tecido irradiado (PINHEIRO *et al.*, 2002), é importante evidenciar que a maioria desses estudos é em cultura de células (SROKA *et al.*, 1999, PINHEIRO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2004; RENNO *et al.*, 2007) o que não reflete a realidade da complexa biologia do câncer. Então, a associação do laser ao imiquimode como terapia para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral, pode ser investigada, pois a fototerapia laser ativa as defesas celulares e humorais, aumentando a liberação de citocinas (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do uso do imiquimode e do laser em baixa intensidade ($\lambda 660\text{nm}$) no câncer quimicamente induzido por DMBA em mucosa oral de hamsters sírios dourados, através de estudo histológico e imunoistoquímico das células dendríticas S-100 positivas.

4 METODOLOGIA

4.1 Respaldo ético da pesquisa

Nesta pesquisa foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008.

O protocolo de pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), tendo parecer favorável (**Anexo A**).

4.2 Caracterização e manipulação da amostra

Para a realização da pesquisa foram utilizados 25 hamsters machos da raça Syrian (*Mesocricetus auratus*), variedade dourado, com aproximadamente seis semanas de idade, e peso médio de 120g. Para que os animais fossem incluídos no experimento foi necessário serem da raça proposta e não apresentarem problemas de saúde. Os animais foram obtidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, e passaram por um período de sete dias de ambientação no biotério de manutenção do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA). Durante todo o experimento, os animais foram alimentados com dieta sólida, ração padrão do biotério (Nuvital® NUVILAB, São Paulo, SP, Brasil), e água *ad libidum*. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais plásticas com cobertura

metálica e assoalho forrado por maravalha e permaneceram à temperatura controlada de 22°C e luminosidade natural. Todas as gaiolas foram etiquetadas durante o período de estudo, conforme o grupo a que pertenciam os animais. Os procedimentos de alimentação foram realizados diariamente durante todo o período do experimento, trocando-se a maravalha e lavando-se as gaiolas com água e sabão a cada 48 horas, propiciando assim, condições favoráveis de higiene e preenchendo os requisitos físico-químicos para a saúde e bem-estar dos animais.

4.3 Organização dos grupos

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos, de acordo com a distribuição apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1: Distribuição dos Grupos Experimentais (MONTEIRO, 2010).

Grupo	Tratamento	No. de animais
1	Controle I (sacrifício 48h após a carcinogênese química)	5
2	Controle II (sacrifício quatro semanas após carcinogênese química)	5
3	Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	5
4	Imiquimode	5
5	Imiquimode + Laser ($\lambda 660\text{nm}$)	5

4.4 Indução do câncer

O método escolhido para a indução dos tumores foi através de aplicações tópicas do carcinógeno DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno – Fluka Analytical Lab. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Todos os animais foram previamente induzidos para o desenvolvimento dos tumores. Inicialmente cada animal foi pesado e anestesiado (Zoletil 50[®] -

Cloridrato de Zolazepam – Laboratório Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 0,5mg/Kg de peso, por via intramuscular, tornando-o cooperativo com o procedimento. Para facilitar o manuseio do animal na aplicação do agente carcinogênico, foi utilizado um aparato de contenção do animal, na forma de um cilindro oco de latão de 77mm de altura, 47mm de diâmetro e 2mm de espessura (**Fig. 2**). A extremidade superior é parcialmente fechada, delimitando um orifício de 21mm de diâmetro no centro do cilindro. O cilindro apresenta dobradiças que permitem a sua abertura e o seu fechamento. O orifício central usinado em forma de V acomodava a pele abundante ao redor do pescoço do animal. Postes localizados a 90mm do centro da referida base e suas pontas recurvadas servem de inserção elásticos que se prendiam aos incisivos superiores e inferiores dos animais. Uma vez posicionado o animal, foi possível afastar com auxílio de uma pinça Adson serrilhada, a mucosa da bolsa jugal permitindo acesso para ser limpa e seca com gaze e hastes flexíveis de algodão (**Fig. 3**).

A mucosa limpa foi previamente escarificada utilizando um dispositivo de fabricação própria que consistiu de fios ortodônticos inoxidáveis 0,9mm (Morelli[®] - São Paulo, SP, Brasil) espetados numa base de acrílico autopolimerizante (Jet, Artigos Odontológicos Clássico Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (**Fig.4**). O procedimento de escarificação foi realizado de forma firme e com pressão uniforme em todos os animais, sempre pelo mesmo operador, obtendo-se leves arranhões na mucosa.

Para a indução das lesões foram realizadas aplicações tópicas do carcinógeno DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno – Fluka Analytical Lab.

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (**Fig. 5**), diluído à concentração de 0,5% em óleo mineral (Nujol[®] Mantecorp, São Paulo, Brasil). Para aplicação da solução de DMBA foi utilizado um pincel de cerdas com área de 0,7 x 0,7cm, embebido no líquido, sendo o excesso eliminado por pressão do mesmo na parede interna do frasco. Em seguida, foi aplicado sobre a mucosa das paredes e fundo da bolsa jugal direita dos animais em suaves movimentos, foram realizadas cerca de sete pinceladas consecutivas padronizadas, deixando deste modo, resíduos do carcinógeno aderidos à mucosa. A frequência de aplicação foi de três vezes por semana, por um período de oito semanas, sempre pelo período da manhã. A mucosa jugal esquerda foi preservada para não prejudicar a armazenagem provisória de alimentos na bolsa e reduzir a ingestão de sólidos e líquidos. Este procedimento impede a morte prematura dos animais.

Nos animais dos grupos controle foi realizada apenas a indução das lesões, sendo que os animais do grupo controle I foram sacrificados 48 horas após este período de carcinogênese química, para que fosse comprovado o desenvolvimento dos tumores, e os animais do grupo controle II, após a carcinogênese química, permaneceram por um período de quatro semanas sem nenhum tipo de tratamento. Durante o período experimental de indução do câncer, sete animais vieram a óbito entre a segunda e quarta semanas sendo prontamente substituídos.

4.5 Tratamentos

Os tratamentos propostos foram iniciados 48 horas após a última aplicação do carcinógeno, ao final do período de oito semanas de indução do câncer e observados macroscopicamente.

4.5.1 Imiquimode

Após anestesia geral via intramuscular (Zoletil 50[®]- Cloridrato de Zolazepam – Laboratório Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), os animais dos grupos 4 e 5 receberam aplicação de imiquimode (Aldara[®] creme 5% – 3M Health Care Limited, Loughborough, Leicestershire, Reino Unido **Fig. 6**). A bolsa jugal foi afastada com auxílio de uma pinça Adson serrilhada, permitindo acesso à mucosa para ser limpa e seca com gaze e hastes flexíveis de algodão. Em cada aplicação foi depositado aproximadamente 50 mg do creme imiquimode com auxílio de uma mini espátula plástica descartável uniformemente no local das lesões com margem de segurança de 0,5cm (**Fig. 7**). Devido ao efeito da anestesia a absorção da droga na mucosa era facilitada. Após os procedimentos os animais eram liberados para se recuperarem do efeito do anestésico em suas gaiolas. O tratamento foi feito três vezes por semana, durante o período de quatro semanas, sempre no período da manhã.

Durante o período de tratamento com imiquimode um animal apresentou acentuada reação inflamatória, com formação de abscesso extraoral, sendo excluído da pesquisa e prontamente substituído.

4.5.2 Laser ($\lambda 660\text{nm}$)

Os animais dos grupos 3 e 5 foram irradiados com o aparelho diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl, Bio Wave[®] Kondortech, São Carlos, SP, Brasil, **Fig. 8**) que possui duas ponteiros independentes as quais emitem laser em dois comprimentos de onda diferentes: $\lambda 660\text{nm}$, espectro vermelho, e a outra ponteira que emite laser no espectro infravermelho de $\lambda 790\text{nm}$, sendo o diâmetro do feixe nas ponteiros de 3mm. Para este estudo foi escolhido o laser no espectro vermelho, com densidade de energia de $95\text{J}/\text{cm}^2$, aplicada pontualmente no local das lesões exofíticas papilomatosas, por contato, resultando num tempo total de 133 segundos (**Fig.9**) e os parâmetros de utilização do laser estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2: Aparelho e parâmetros utilizados na fototerapia laser (MONTEIRO, 2010).

<i>Laser</i>	<i>AsGaAl</i>
Aparelho	Biowave [®] Kondortech (São Carlos, São Paulo, Brasil)
Comprimento de onda (nm)	660
Potência output (mW)	50
Densidade de Potência (mW/ cm^2)	714,2
Modo	Contínuo
Modo de aplicação	Contato
Densidade de energia (J/cm^2)	95
Energia (J)	6,65
Tempo de exposição (s)	133
Área de irradiação (cm^2)	0,07
Diâmetro do spot (mm)	3

Para a determinação da potência do aparelho laser, foi utilizado o potenciômetro Thorlabs PM30 (Newton, NJ, USA, **Fig.10**) que é um sistema de medição da potência através de um sensor ótico. A leitura referente ao aparelho de laser ajustado na máxima potência, no $\lambda 660\text{nm}$ correspondeu a 50 mW, sendo esta a potência utilizada. Além disso, também foi realizado o teste para calcular quanto de potência era perdido através do creme imiquimode, para o caso do grupo 5 (tratado com imiquimode e laser), pois quando ocorria coincidência dos tratamentos no mesmo dia, a aplicação do creme imiquimode era feita antes da irradiação com laser em baixa intensidade. Neste teste foi utilizada uma placa de vidro com 7mm de espessura, e apenas o feixe laser passando por esta placa resultou num valor de potência de 38 mW e quando da presença do creme imiquimode, a leitura mostrou um valor de 34 mW, resultando numa perda de 4mW. O cálculo da densidade de energia para quando o laser era utilizado na presença do creme imiquimode foi de $87,4 \text{ J/cm}^2$, e o percentual de perda de energia é 8%, considerada aceitável.

O tratamento quando indicado foi realizado a cada 48hs durante quatro semanas. Para os procedimentos de irradiação não foi utilizado o aparato de contenção animal tendo em vista ser necessário manter o animal por mais de dois minutos na mesma posição até o fim da irradiação. Sendo a posição no aparato de difícil controle da respiração e salivação, podendo levar o animal ao óbito, então foi adotada a posição de decúbito dorsal. De acordo com a legislação vigente, o laser foi aplicado em local isolado, com caracteres e simbologia internacional para área em uso ou presença de radiação, observando-se os procedimentos de segurança recomendados para tratamento

com laser. Os animais não apresentaram intercorrências no período de tratamento e permaneceram em condições apropriadas até o fim do experimento.

4.6 Caracterização do aspecto clínico

Todas as lesões foram avaliadas clinicamente de forma descritiva e as mais significativas foram fotografadas com uma câmara fotográfica digital (Sony® Cyber-Shot DSC-W270, 12.1 Mega pixels, Sony Eletronics Inc., San Diego, CA, USA).

4.7 Preparo das amostras

A morte animal foi feita com overdose de anestésico geral (Zoletil 50®- Cloridrato de Zolazepam – Laboratório Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), oito semanas após o início da indução química e após doze semanas com ou sem tratamento. Após a constatação da morte dos animais pelos sinais vitais e com auxílio de lâminas de bisturi n°. 15 montadas em cabo Bard Parker foram removidas completamente as bolsas jugais direitas de todos os animais, e cinco bolsas jugais esquerdas íntegras escolhidas aleatoriamente. As peças foram acondicionadas em frascos plásticos contendo formol a 10% com volume igual a 10 vezes o volume da peça, por 24 horas até o momento de sua preparação. Cada recipiente foi identificado com o número do animal e com o número do grupo. As amostras fixadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Cirúrgica Bucal do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da

Bahia – FOUFBA. Os espécimes foram identificados e processados de acordo com a rotina para inclusão em parafina e submetidos à microtomia, sendo realizados cortes de 5 μm de espessura destinados à coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E).

A imunistoquímica foi realizada no Laboratório de Imunistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em cortes de 3 μm . O protocolo de imunomarcção utilizou o sistema EnVision™ (Dako Cytomation, Califórnia, USA) e está descrito no **Apêndice A**. O anticorpo primário usado foi o policlonal anti-proteína S-100 (Dako Cytomation, Califórnia, USA) na diluição de 1:700 em albumina de soro bovino (BSA), cujas especificações estão descritos na **Tabela 3**. O procedimento foi realizado com auxílio da máquina para marcação imunistoquímica Dako Autostainer – Universal Staining System (Dako Corporation, Carpinteria, Califórnia, USA). Para o controle positivo reação imunistoquímica foi utilizado um tecido de granuloma piogênico da cavidade bucal com conhecida positividade para o anticorpo primário policlonal anti-proteína S-100.

Tabela 3: Clone, especificidade, diluição, tratamento de recuperação antigênica, e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado (MONTEIRO, 2010).

<i>Marca</i>	<i>Clone</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tratamento de recuperação antigênica</i>	<i>Tempo de incubação</i>
DAKO	S-100 (Z0311)	Células dendríticas Células de Langerhans Células de Schwann	1:700	Sem tratamento	30'

4.8 Metodologia para gradação histológica

O estudo morfológico por microscopia de luz utilizou o sistema de gradação histológica publicado pela Organização Mundial da Saúde (GALEN *et al.*, 2005) para gradação histológica da Displasia Epitelial Oral e Carcinomas Escamocelulares da cavidade oral.

Na gradação histológica das displasias, foram considerados os critérios arquitetônicos e citológicos descritos na **Tabela 4**, e classificados em:

- **Displasia Discreta** – Representada pela desorganização arquitetônica limitada ao terço inferior do epitélio acompanhada pela atipia citológica.
- **Displasia Moderada** – Representada pela desorganização arquitetônica estendendo ao terço médio do epitélio, além da atipia citológica.
- **Displasia Severa** – Representada pela desorganização arquitetônica com mais de dois terços do epitélio associado à atipia citológica.

Tabela 4: Critério arquitetônico e citológico usado para a gradação da displasia epitelial oral na classificação da OMS*

Arquitetura	Citologia
1. Estratificação epitelial irregular	1. Variação anormal do tamanho do núcleo
2. Perda da polaridade células basais	2. Variação anormal da forma do núcleo
3. Ramificações em forma de gota	3. Variação anormal do tamanho da célula
4. Aumento do número de figuras de mitose	4. Variação anormal da forma da célula
5. Mitose superficial anormal	5. Aumento da proporção do núcleo-citoplasma
6. Quantidade prematura de células individuais	6. Aumento da forma do núcleo
7. Pérolas de queratina dentro das ramificações	7. Figura de mitose atípica
	8. Aumento do número e tamanho dos nucléolos
	9. Hiperchromatismo

* **Head and Neck Tumours** do capítulo **Epithelial Precursor Lesions In: WHO Classification of Tumour** (GALEN *et al.*, 2005)

Os carcinomas escamocelulares da cavidade oral foram caracterizados histopatologicamente de acordo com o grau de diferenciação em:

- **Bem diferenciado** – tecido semelhante ao epitélio escamoso normal.
- **Moderadamente diferenciado** – contém pleomorfismo nuclear e atividade mitótica distintos, incluindo mitoses anormais; existe geralmente menos queratinização.
- **Pouco diferenciado** – predominam células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, e mínima queratinização.

Esta classificação foi adaptada, na qual foi incluída o termo microinvasivo, que é representado pelos tumores que estavam no mais precoce momento de invasão (NEVILLE *et al.*, 2009).

- **Microinvasivo ou superficialmente invasivo** – representado pela extensão irregular do epitélio lesional através da membrana basal para o interior do tecido conjuntivo subepitelial. As células escamosas individuais e as ilhas ou os cordões de células são observados como se tornando entidades independentes no interior do tecido conjuntivo, sem adesão ao epitélio da superfície. Mostram um citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes e geralmente de coloração intensa (hipercromáticos) e uma relação núcleo-citoplasma aumentada, graus variados de pleomorfismo celular e nuclear, pérolas de ceratina podem ser produzidas no interior do epitélio lesional e células isoladas também podem sofrer ceratinização celular individual.

As imagens histopatológicas dos cortes corados foram capturadas por sistema computadorizado de captura de imagens Axion Vision (Zeiss®, Berlim, Alemanha) e analisadas por um patologista experiente (J.N.S) para classificar

os casos, além de caracterizar o infiltrado inflamatório em discreto, moderado e intenso.

4.9 Exame Imunoistoquímico

Para a descrição dos cortes imunomarcados foi verificado a presença ou ausência de células dendríticas S-100+ na mucosa normal da bolsa jugal do hamster e também no estroma e mucosa adjacente dos tumores e nas displasias dos grupos experimentais.

No estudo quantitativo das células dendríticas S-100+ foram avaliados, em cada lâmina quatro campos histológicos em uma magnitude de 40x, sob um foco fixo com clareza de campo localizados no estroma das lesões em cada grupo de estudo e também na mucosa normal, onde foi anotado o número total de células imunomarcadas neles enquadradas e posteriormente calculado o número médio de células S-100+ em cada animal e o desvio padrão. Para identificação das células dendríticas S-100+ levou-se em consideração o formato fusiforme ou dendrítico propriamente dito, evitando aquelas células em torno de vasos sanguíneos e as próximas a nervos.

As imagens dos cortes imunomarcados foram capturadas por sistema computadorizado de captura de imagens Axion Vision (Zeiss[®], Berlim, Alemanha) analisadas e descritas por um patologista experiente (J.N.S). Para a contagem das células dendríticas S-100+ as lâminas foram examinadas por um observador previamente treinado (J.S.C.M), sendo as amostras mais significativas fotografadas.

4.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes estatísticos utilizando o programa estatístico Bioestat[®] (versão 5.0, Manaus, AM, Brasil) para determinar se ocorreram diferenças estatisticamente significativas na comparação dos grupos avaliados, no que diz respeito ao grau de desenvolvimento das lesões orais. Para verificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fischer (diferenças entre proporções) para comparações múltiplas naqueles subgrupos em que houve diferenças com $p < 0,05$.

Os dados resultantes da contagem de células S-100 imunomarcadas foram analisados estatisticamente para análise da diferença das médias utilizando o teste não paramétrico Mann Whitney, considerando diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos

O aspecto clínico inicial da bolsa jugal dos animais antes das aplicações do carcinógeno não apresentava qualquer alteração clínica que não fosse compatível com mucosa íntegra (**Fig.11**). Na segunda semana de uso do carcinógeno, mais precisamente na quinta aplicação, a maioria dos animais apresentou uma mucosa jugal inflamada, bastante sangrante ao mínimo toque e necrose do fundo da bolsa jugal (**Fig.12**). Na quarta semana, um grande número de animais apresentou uma mucosa jugal semelhante à mucosa íntegra sem sangramento ou qualquer alteração, sendo apenas observada uma diminuição do tamanho da bolsa, devido à parte que foi necrosada (**Fig.13**).

Após o período experimental de indução dos tumores os animais apresentavam alterações clínicas significativas apresentando múltiplas lesões exofíticas papilomatosas de tamanhos variados por toda a mucosa jugal de cada animal (**Fig.14**).

Nos animais apenas tratados com laser não foram observadas alterações clinicamente significantes quando comparados com o aspecto observado no período final da indução dos tumores. Nos animais tratados apenas com imiquimode foram observadas mudanças clínicas no que diz respeito ao aspecto exofítico papilomatoso, pois nos animais que apresentaram estas lesões, elas estavam clinicamente menores (**Fig.15**). No grupo tratado com imiquimode e laser, o aspecto clínico foi bastante heterogêneo entre os animais, sendo que uma mucosa mais hiperemiada pôde ser observado em alguns animais (**Fig.16**).

5.2 Resultados Histológicos

O número de animais por grupo de estudo e o percentual das diferentes gradações histológicas para carcinomas escamocelulares (CEC) e displasias orais pode ser visto na **Tabela 5**.

Tabela 5: Número e percentual de animais por grupo de estudo de acordo com a gradação histológica dos carcinomas e displasias (MONTEIRO, 2010).

<i>GRUPO</i>	<i>Displasia Discreta</i>		<i>CEC bem diferenciado</i>		<i>CEC moderadamente diferenciado</i>		<i>CEC pouco diferenciado</i>	
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Controle I	0	0	4	80	1	20	0	0
Controle II	0	0	5	100	0	0	0	0
Laser (λ660nm)	0	0	2	40	1	20	2	40
Imiquimode	3	60	2	40	0	0	0	0
Imiquimode + Laser	2	40	2	40	0	0	1	20

(n) número de animais; (CEC) carcinoma escamocelular

A seguir encontra-se descrito o percentual de gradações histológicas para carcinomas e displasias nos grupos experimentais.

5.2.1 Grupo Controle I

A análise histológica evidenciou que 100% dos espécimes apresentaram características de malignidade; 20% classificados como carcinomas escamocelulares (CEC) moderadamente diferenciados e 80% CEC bem diferenciados, sendo 60% destes microinvasivos (**Fig. 17**). O infiltrado inflamatório foi predominantemente crônico variando de discreto a intenso, nos diferentes animais.

5.2.2 Grupo Controle II

Nos animais do grupo controle II foram verificados 100% de CEC bem diferenciados (**Fig. 18**). Na maioria dos animais (60%) o infiltrado inflamatório foi crônico discreto.

5.2.3 Grupo Experimental Laser ($\lambda 660\text{nm}$)

A análise histológica constatou 40% de CEC bem diferenciados (microinvasivos), 20% CEC moderadamente diferenciado (**Fig. 19**) e 40% CEC pouco diferenciados (**Figs. 20 e 21**). O infiltrado inflamatório foi crônico discreto em 100% dos animais.

5.2.4 Grupo Experimental Imiquimode

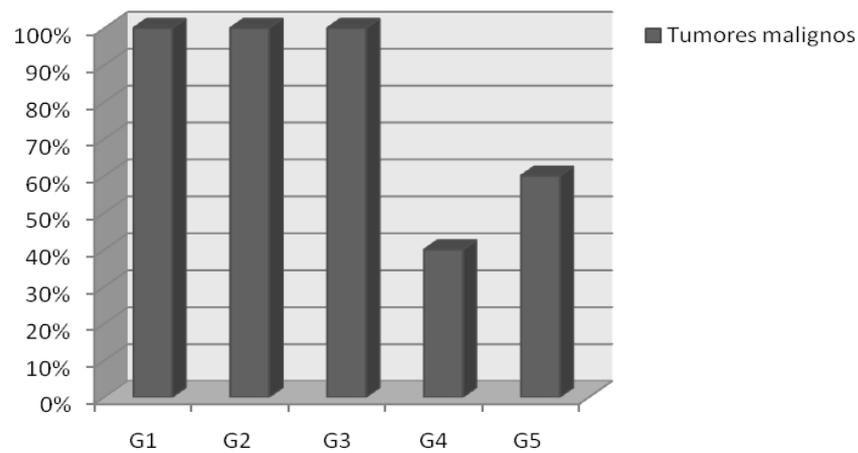
Neste grupo 40% das amostras demonstraram CEC bem diferenciados (microinvasivos) e 60% de displasias discretas (**Fig. 22**), 100% dos animais apresentaram infiltrado inflamatório crônico discreto.

5.2.5 Grupo Experimental Imiquimode associado com Laser ($\lambda 660\text{nm}$)

A associação do imiquimode com o laser demonstrou heterogenicidade nos resultados, sendo 20% de CEC pouco diferenciado, 40% de displasias discretas e 40% de CEC bem diferenciados. O infiltrado inflamatório foi crônico discreto em 100% dos animais

Todas as gradações histológicas dos carcinomas (bem, moderadamente e pouco diferenciados) foram agrupadas como tumores malignos obtendo-se um percentual total de malignidade por grupo experimental que pode ser visualizado na **Fig. 23**.

Fig. 23: Percentual dos tumores malignos por grupo experimental (MONTEIRO, 2010).



*G1- Controle 1; G2- Controle 2; G3- Laser; G4- Imiquimode; G5- Imiquimode+laser.

Após a análise estatística comparando-se os grupos controle (I e II) com os demais grupos, excluindo-se os casos de displasia, houve maior quantidade de casos de CEC bem diferenciados, sendo estatisticamente significante nos grupos controle ($p=0,0376$, Teste exato de Fischer).

Não houve diferença estatística entre os casos de displasia discreta, que foram observados apenas nos grupos tratados com imiquimode e imiquimode associado ao laser.

Nos grupos tratados com laser e também imiquimode associado ao laser foram observados CEC's pouco diferenciados, mas comparando-se estes grupos não foi possível demonstrar maior probabilidade do tratamento com laser favorecer um CEC pouco diferenciado.

Apesar de maior número de carcinomas no grupo tratado com laser, quando este foi comparado com o grupo imiquimode não foi encontrada diferença estatística significante na quantidade de CEC's em cada grupo.

5.3 Resultados imunoistoquímicos

De modo geral não foram evidenciadas células dendríticas S-100+ no parênquima das lesões, aspecto este comprovado pelo controle positivo da reação. No entanto, estas foram evidenciadas no estroma e no tecido conjuntivo das mucosas tratadas.

5.3.1 Mucosa normal

A mucosa normal íntegra da bolsa jugal dos hamsters apresentou muitas células S-100+ ora mais dendríticas, ora mais fusiformes no conjuntivo (**Fig. 24**).

5.3.2 Grupo Controle I

A análise imunoistoquímica evidenciou ausência de células S-100+ no estroma dos tumores. E nas áreas adjacentes ao tumor elas foram encontradas apresentando vários prolongamentos dendríticos ou no formato fusiforme.

5.3.3 Grupo Controle II

Neste grupo foi observada a ausência de células S-100+ no estroma dos tumores e poucas nas áreas de mucosa adjacente.

5.3.4 Grupo Experimental Laser ($\lambda 660\text{nm}$)

Foi constatada a ausência de células S-100+ no estroma dos tumores, enquanto que aquelas que estavam presentes na mucosa adjacente eram escassas e mais fusiformes (**Figs. 25,26 e 27**).

5.3.5 Grupo Experimental Imiquimode

Neste grupo notou-se a presença de células dendríticas S-100+ no estroma dos tumores, bem como na lâmina própria subjacente às displasias.

Na mucosa adjacente foram encontradas células dendríticas S-100+ no formato fusiforme e também com longos prolongamentos dendríticos (**Fig. 28 e 29**).

5.3.6 Grupo Experimental Imiquimode associado com Laser ($\lambda 660\text{nm}$)

Este grupo demonstrou que dois animais apresentavam pouquíssimas células dendríticas S-100+ na área correspondente à displasia, bem como na mucosa adjacente. Os outros três animais não apresentavam células dendríticas S-100+ no estroma dos tumores.

A gradação histológica, o infiltrado inflamatório e o número médio de células dendríticas S-100+ no estroma dos carcinomas e nas displasias dos grupos estudados e também na mucosa íntegra encontram-se referenciados na **Tabela 6**.

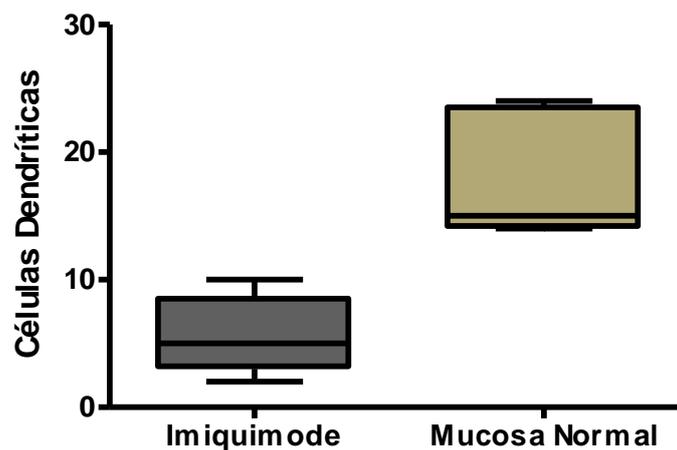
Devido aos resultados negativos para células dendríticas S-100+ nos grupos controle I, controle II, laser ($\lambda 660\text{nm}$) e imiquimode e laser não foi possível utilizá-los na análise estatística. Portanto foi realizada apenas a análise estatística do grupo imiquimode, comparando suas médias encontradas com os valores de médias referentes ao tecido de mucosa jugal normal do hamster. Apesar de o grupo imiquimode ter apresentado maior número de células dendríticas S-100+ no estroma dos tumores e na lâmina própria subjacente às displasias quando comparado aos demais grupos experimentais, houve uma diminuição estatisticamente significativa quando este grupo foi comparado com a mucosa normal ($p= 0,0079$, Teste de Mann Whitney), conforme ilustrado na **Fig. 30**.

Tabela 6: Gradação histológica, infiltrado inflamatório, número médio de células S-100+ e o desvio padrão, no estroma dos tumores, nas displasias dos grupos experimentais e na mucosa normal íntegra da bolsa jugal do hamster (MONTEIRO, 2010).

Grupos Experimentais	Animais	Gradação histológica	Infiltrado inflamatório	No. médio de células S-100 positivas ± DP
Controle I	1	CEC BDm	Crônico discreto	0
	2	CEC BD	Crônico moderado	0
	3	CEC BDm	Crônico intenso	0
	4	CEC BDm	Crônico intenso	0
	5	CEC MD	Misto moderado	0
Controle II	6	CEC BD	Crônico discreto	0
	7	CEC BD	Crônico moderado	0
	8	CEC BD	Misto moderado	0
	9	CEC BD	Crônico discreto	0
	10	CEC BD	Crônico discreto	0
Laser	11	CEC BDm	Crônico discreto	0
	12	CEC PD	Crônico discreto	0
	13	CEC BDm	Crônico discreto	0
	14	CEC PD	Crônico discreto	0
	15	CEC MD	Crônico discreto	0
Imiquimode	16	CEC BDm	Crônico discreto	5±4,08
	17	DD	Crônico discreto	2,5±1,29
	18	CEC BDm	Crônico discreto	10,5±4,5
	19	DD	Crônico discreto	4±2,7
	20	DD	Crônico discreto	7,5±2,08
Imiquimode e Laser	21	CEC PD	Crônico discreto	0
	22	DD	Crônico discreto	1±1,15
	23	DD	Crônico discreto	1±0,81
	24	CEC BD	Crônico discreto	0
	25	CEC BD	Crônico discreto	0
Mucosa normal íntegra	26	-	-	23,5±9,32
	27	-	-	14,25±6,18
	28	-	-	13,75±5,73
	29	-	-	15±5,31
	30	-	-	23,75±5,67

(CEC) carcinoma escamocelular, (BD) bem diferenciado, (BDm) bem diferenciado microinvasivo, (MD) moderadamente diferenciado, (PD) pouco diferenciado, (DD) displasia discreta, (DP) desvio padrão.

Fig. 30: Resultado da análise estatística pelo teste de Mann Whitney, para o grupo Imiquimode (MONTEIRO, 2010).



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a bolsa jugal do hamster sírio dourado foi o modelo utilizado para a indução da carcinogênese experimental com DMBA. Este método foi empregado tendo em vista ser aquele que apresenta alta similaridade aos eventos que representam o câncer oral humano, em especial o carcinoma escamocelular (SCHWARTZ *et al.*, 2000, GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 2004).

Os tecidos da bochecha de hamsters considerados mais velhos (18 semanas de idade) são os mais resistentes aos carcinógenos do que aqueles correspondentes aos hamsters jovens. Entretanto não há diferença na resposta aos carcinógenos entre seis e nove semanas de idade. Cinco semanas parece ser a idade ideal para hamsters utilizados para fins experimentais de carcinogênese oral do ponto de vista da facilidade de manipulação e de produção do tumor (MORRIS, 1961). No presente estudo foram utilizados hamsters com aproximadamente seis semanas de idade. Isto está de acordo com vários estudos utilizando hamsters com essa mesma idade para produzir carcinomas escamocelulares experimentais (MACDONALD, SHEPHERD e CRITCHLOW, 1986; CHEN e LIN, 2001; LI *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010).

Neste estudo, a indução química da carcinogênese foi realizada utilizando o DMBA, que desde 1954 até os dias atuais é usado com muito sucesso para a indução de carcinomas celulares escamosos na mucosa oral de hamsters sírios dourados. (SALLEY, 1954; LI *et al.*, 2002; GIMENEZ-CONTI

e SLAGA, 2004; SILVEIRA Jr *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010; FARWELL *et al.*, 2010; LAJOLO *et al.*, 2010).

O óleo mineral é o veículo de escolha para este carcinógeno. Em 1961, Morris realizou um estudo confirmando que o DMBA 0,5% em óleo mineral foi a melhor concentração para a rápida indução de tumores em mucosa oral de hamster, produzindo a resposta máxima do tumor com o mínimo período de latência, sem perda de animais devido à toxicidade. Esta concentração foi a escolhida no presente estudo por ser normalmente utilizada (LI *et al.*, 2002; GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 2004)

A frequência de aplicações do carcinógeno DMBA de três vezes por semana utilizada neste estudo, também foi empregada em estudos prévios. (LI *et al.*, 2002; SILVEIRA Jr *et al.*, 2004; GIMENEZ-CONTI e SLAGA, 2004; BOLANHO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010). Um menor período de latência é necessário para o desenvolvimento de tumores em animais expostos a três aplicações semanais do que aqueles que receberam duas aplicações por semana (MORRIS, 1961).

A escarificação é uma etapa do procedimento de indução dos tumores utilizada por Fujita e colaboradores (1973) com auxílio de uma lima endodôndica. Segundo Fassoni (1992) a escarificação prévia não é eficaz na diminuição do tempo e no aumento da frequência das lesões cancerizáveis em carcinomas DMBA-induzidos. Apesar da etapa de escarificação da mucosa antes das aplicações do DMBA não ser uma etapa imprescindível para a indução dos tumores, no presente estudo a mucosa foi previamente escarificada por proporcionar o melhor contato do carcinógeno com o tecido,

além de ser um fator irritante crônico local, que é considerado por alguns autores um fator promotor do carcinoma oral escamocelular (SCIUBBA *et al.*, 2001).

O tempo necessário para o aparecimento dos tumores induzidos por DMBA é bastante heterogêneo na literatura estudada, desde quatro até 25 semanas. A idade dos animais, concentração do carcinógeno DMBA, o veículo de diluição, a frequência de aplicações e outras variáveis influenciam diretamente no tempo de desenvolvimento experimental dos tumores. Devido a isso, de acordo com os parâmetros definidos para indução, optou-se realizar as aplicações do carcinógeno pelo período de oito semanas, conforme estudos prévios (POSPISIL e MACDONALD, 1981; MACDONALD, SHEPHERD e CRITCHLOW, 1986; MACDONALD e CRITCHLOW, 1987; LIN *et al.*, 1997).

Aplicações tópicas de DMBA 0,5% em óleo mineral três vezes por semana, induzem alterações hiperplásicas em quatro semanas, displasia em 4-6 semanas, carcinoma *in situ* em 6-8 semanas, carcinoma em 8-10 semanas e carcinoma invasivo em 10-12 semanas, e carcinomas extensos com invasão e necrose superficial, em 12-14 semanas (GHIABI, GALLAGHER e WONG, 1992; LIEBOW *et al.*, 1994). Essas alterações histopatológicas do epitélio oral são semelhantes, se não idênticas, as biópsias de lesões orais humanas malignas e pré-malignas (GHIABI, GALLAGHER e WONG, 1992).

Neste estudo, durante a segunda semana de desenvolvimento do câncer foi observada clinicamente uma mucosa jugal inflamada e necrose do fundo das bolsas na maioria dos animais do experimento (SALLEY, 1954 e MORRIS, 1961). Na quarta semana, esta inflamação era menos marcante e a

mucosa basicamente normal (HASSANIN, ASHRAFI e DAS, 1987). As observações clínicas ao final de oito semanas demonstraram a presença de múltiplos e pequenos papilomas por toda a área da mucosa jugal dos animais (SALLEY, 1954 e MORRIS, 1961).

O grupo controle I, com sacrifício de 48 horas após a última aplicação do carcinógeno, mostrou 100% de tumores malignos, corroborando com os achados de Lin e colaboradores (1997) que obtiveram 100% de incidência de tumor na bolsa jugal de hamster após aplicação de DMBA no mesmo protocolo. E o grupo controle II, mesmo após um período de quatro semanas sem nenhum tipo de indução, nem tratamento, permaneceu com 100% de malignidade, o que demonstra o caráter irreversível da carcinogênese química, mesmo na ausência do estímulo (LUTZ, 2000, GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001).

Muitos trabalhos têm sido descritos na literatura relatando o uso de imiquimode para o tratamento de carcinomas escamocelulares na pele (HUANG *et al.*, 2009; WARSHAUER e WARSHAUER, 2008; SINGH e BUNKER, 2007; TILLMAN e CARROLL, 2007), incluindo os tipos invasivos (MARTÍN-GARCÍA, 2005; FLÓREZ *et al.*, 2004; NOURI, O'CONNEL e RIVAS, 2003). Devido à escassez na literatura do seu uso em carcinomas escamocelulares nas mucosas, o presente estudo foi desenvolvido com aplicações do imiquimode creme 5% em mucosa oral de hamsters, baseado em trabalhos existentes na literatura que descrevem o seu uso para outras patologias em mucosas orais, (SPIETH *et al.*, 2006; YASAR *et al.*, 2009; PONTES, SERRÃO e FIADEIRO, 2010) e nasais (CLEIAN *et al.*, 2005).

De acordo com o modo de aplicação recomendado pelo fabricante 3M Pharmaceuticals (1997) para tratamento de carcinoma superficial basocelular deve-se aplicar creme suficiente para cobrir a área de tratamento, incluindo um centímetro de pele em volta do tumor. No presente estudo devido às dimensões reduzidas da mucosa jugal dos animais foi utilizada uma margem de segurança de 0,5 cm (SPIETH *et al.*, 2006).

A frequência de aplicação e a duração do tratamento com o imiquimode creme diferem de acordo com a indicação clínica, além disso, diferentes protocolos têm sido adotados na literatura. Alguns estudos relatam aplicações cinco dias consecutivos por semana (FESTA NETO, 2002; MARTÍN-GARCÍA, 2005), mas no presente estudo foi determinado uma frequência de aplicação de três vezes semanais conforme estudos prévios (BUKHARDT PÉREZ *et al.*, 2007; SPIETH *et al.*, 2006) visto que a absorção da droga a partir de superfícies mucosas pode ser maior do que o esperado podendo resultar em maior efeito adverso (YASAR *et al.*, 2009).

Na literatura ainda são relatados diversos períodos de duração no uso da terapia com imiquimode para carcinoma escamocelular na pele, variando de duas semanas (SMITH, HAMZA e SKELTON, 2004), passando até por períodos de quatro semanas (RUIZ-VILLAVARDE, SÁNCHEZ-CANO e BURKHARDT-PÉREZ, 2009) seis semanas (BUKHARDT PÉREZ *et al.*, 2007; NOURI, O'CONNEL e RIVAS, 2003), 12 semanas (MARTÍN-GARCÍA, 2005), até mesmo 16 semanas (FESTA NETO, 2002). Neste estudo foi estabelecido o período de quatro semanas, visto que não são encontrados relatos na literatura do uso em carcinomas escamocelulares da cavidade oral, e está dentro do

período máximo de uso recomendado pelo fabricante 3M Pharmaceuticals (1997) de até 12 semanas.

No presente estudo as lesões quimicamente induzidas por DMBA em mucosa oral de hamsters que foram tratadas apenas com imiquimode revelaram menores números de tumores malignos quando comparado aos demais grupos de estudo e apresentaram maior número de displasias discretas (60%). É possível que esse tratamento tenha resultados ainda melhores com o período de duração do tratamento estendido por um maior tempo (BUKHARDT PÉREZ *et al.*, 2007; NOURI, O'CONNEL e RIVAS, 2003).

Este estudo não foi capaz de estabelecer se o tratamento com imiquimode reduziu tumores malignos a lesões displásicas discretas ou impediu o desenvolvimento desses tumores, portanto novos estudos devem ser desenvolvidos para que o imiquimode seja uma terapia adjuvante no tratamento de carcinomas escamocelulares da cavidade oral.

A luz laser é uma forma de energia não-ionizante, ao contrário de outras formas de radiação usadas terapeuticamente, tais como raios X, gama e nêutrons. A radiação laser não é invasiva e é bem tolerada pelos tecidos, não possuindo efeitos mutagênicos. (PINHEIRO, BRUGNERA JUNIOR e ZANIN, 2010). Porém a utilização do laser em baixa intensidade em condições cancerosas pode apresentar respostas estimulatórias ou inibitórias na proliferação celular. Muitos estudos demonstram a estimulação das células malignas (OCAÑA-QUERO *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2004; RENNO *et al.*, 2007), mas é importante evidenciar que a maioria desses estudos é em cultura de células o que não reflete a realidade da complexa

biologia do câncer. Devendo ser salientado o fato de que estudos *in vitro* normalmente não refletem as mesmas condições encontradas *in vivo*. Pois em estudos com culturas de células, os aspectos como o sistema imune, microcirculação vascular e revestimento epitelial não são observados. Ressalta-se que o revestimento epitelial em condições clínicas reflete, espalha e absorve a luz, além disso, ativa as defesas celulares e humorais, aumentando a liberação de fatores de crescimento e citocinas nos tecidos irradiados (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010).

A estimulação ou inibição das funções dos fotorreceptores, que fazem parte da cadeia respiratória celular, determina a magnitude da proliferação das células. A dose de irradiação e a energia são os parâmetros mais importantes na fotobiomodulação, se a dose for muito alta pode-se ter um resultado negativo, não estimulatório ou até mesmo inibitório (CARNEVALLI *et al.*, 2003; SCHINDL *et al.*, 2000).

Os efeitos da fotobiomodulação laser em baixa potência no processo de proliferação celular são influenciados de acordo com o tempo de exposição, a densidade de energia e o comprimento de onda, além do tipo de tecido e a sua capacidade de absorção (GENOVESE, 2007). Castro e colaboradores (2005) e Werneck e colaboradores (2005) realizaram estudos irradiando células KB e H.Ep.2 respectivamente, com laser em baixa intensidade ($\lambda 685\text{nm}$, $4\text{J}/\text{cm}^2$) Eles observaram que a fotobiomodulação laser promoveu um efeito estimulador na proliferação das células. No presente estudo, o grupo tratado apenas com Laser ($\lambda 660\text{nm}$) mostrou 100% de tumores malignos, sendo ainda 40% CEC pouco diferenciados. Porém não existe diferença estatisticamente

significante que comprove maior probabilidade do Laser em desenvolver carcinomas pouco diferenciados.

O presente estudo parece estar de acordo com aquele realizado por nosso grupo (MONTEIRO *et al.*, 2009) utilizando um laser diodo de $\lambda 660\text{nm}$, com densidade de energia de 4 J/cm^2 para irradiar lesões displásicas quimicamente induzidas por DMBA em hamsters, resultando num maior grau de desenvolvimento dessas lesões, porém não estatisticamente significativa.

Estudos realizados por Schaffer e colaboradores (1997) e Sroka e colaboradores (1999), utilizando uma linhagem de carcinoma de células escamosas da mucosa gengival humana, mostraram uma diminuição do índice mitótico nas densidades de energia entre $2-8 \text{ J/cm}^2$, nos comprimentos de onda de 805nm , 630nm e 635nm . E parece estar em contraste com nossos resultados.

Karu e colaboradores (1995) sugerem que a coerência não é importante quando efeitos biológicos são esperados, uma vez que as luzes coerentes e incoerentes são efetivas na indução de respostas biológicas. A coerência não parece ser importante para as respostas biológicas em monocamadas celulares, camadas finas ou suspensões celulares e na superfície dos tecidos. Mas o efeito da coerência pode ser observado mais profundamente nos tecidos, uma vez que todos os comprimentos de onda não ionizantes atuam enquanto permanecer a coerência de luz (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). No presente estudo a fonte de luz utilizada é coerente, atuando mais profundamente nos tecidos.

Nem todos os tecidos ou culturas de células responderão a irradiação exatamente da mesma forma. A razão disso é a natureza heterogênea dos tecidos ou cultura de células, por exemplo, no que diz respeito a suas atividades proliferativas (KARU, 1998).

Protocolos clínicos da irradiação de lesões superficiais geralmente defendem o uso de luz visível vermelha (PINHEIRO *et al.*, 1998). Segundo KARU (1998) os efeitos biológicos da irradiação dependem do comprimento de onda, e são do mesmo tipo para eucariontes e procariontes, sendo máximo em todas as bandas de luz visível. Um dos principais efeitos da absorção de luz visível é a excitação das mitocôndrias, o que resulta num aumento da energia celular e na ativação da síntese de ácidos nucléicos (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). No presente estudo, foi utilizado o laser visível vermelho ($\lambda 660\text{nm}$) devido ao seu maior efeito na superfície, causado principalmente pela alta absorção desse comprimento de onda pelos fotorreceptores não específicos (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010). Esta luz é bem absorvida pelos filamentos intermediários que fazem parte do citoesqueleto celular e estão relacionadas à divisão das células (CARNEVALLI *et al.*, 2003). Estudos usando células em cultura têm sugerido a ocorrência de despolarização e desorganização do citoesqueleto 48h após a irradiação com laser vermelho visível, já as culturas de células não-irradiadas não apresentaram essas alterações (SUND e AXELROD, 2000; DIAKONOVA, BOKOCH, SWANSON, 2002; CARNEVALLI *et al.*, 2003).

Tem sido mostrado que a luz laser em baixa intensidade modula a função imune celular *in vitro*, contudo pouco é conhecido sobre os efeitos da

radiação laser na atividade celular imune em modelo animal (MAS, 2010; NOVOSELOVA *et al.*, 2006a).

Estudos demonstram que a luz laser é capaz de aumentar a produção de ATP nos linfócitos, aumentando sua proliferação (GULSOY, 2006; WASIK *et al.*, 2007; BENEDICENTI *et al.*, 2008), além de induzir o estímulo da atividade secretória das células: estimulação de IL-2 e óxido nítrico, bem como um aumento na atividade das células *natural killer* e o aumento na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-6, melhorando a resposta imune (NOVOSELOVA *et al.*, 2006a; NOVOSELOVA *et al.*, 2006b; GULSOY, 2006) A luz laser atua sobre a imunidade celular, visto que produz uma ação imunomoduladora sobre linfócitos T e imunoestimulante em linfócitos B, potencializando a capacidade fagocitária de neutrófilos (HU *et al.*, 2007). No presente estudo, de modo geral foi encontrado infiltrado inflamatório crônico discreto nas lesões quimicamente induzidas.

Na literatura observa-se que os efeitos do imiquimode e do laser em tumores malignos são documentados individualmente. Enquanto que o imiquimode inibe o crescimento dos tumores (HUANG *et al.*, 2009; WARSHAUER e WARSHAUER, 2008; SINGH e BUNKER, 2007; TILLMAN e CARROLL, 2007), a fotobiomodulação laser tem resultados controversos inibindo (SCHAFFER *et al.*, 1997; SROKA *et al.*, 1999) ou estimulando a proliferação celular (CASTRO *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2009). A associação destas terapêuticas para o tratamento de tumores malignos induzidos por DMBA em mucosa oral de hamsters demonstrou resultados heterogêneos, demonstrando displasia em alguns

animais e carcinomas em outros, indicando a complexidade da biologia do câncer e que novos estudos devem ser realizados para tentar esclarecer estes eventos e o envolvimento dessas terapêuticas.

Num estudo recente realizado por Sommer, Zhu e Scharnweber (2010) fez-se a associação do chá verde que tem conhecido poder antitumoral, com a luz laser ($\lambda 670\text{nm}$) em linhagem de células HeLa (células de câncer cervical humano), obtendo-se extraordinário efeito inibitório, pois a luz laser potencializou o efeito inibitório do chá verde sobre as células cancerosas.

Para o reconhecimento das células dendríticas nos referidos espécimes inicialmente utilizou-se a imunistoquímica para CD1a, um imunomarcador fenotípico de células de Langerhans. Segundo Headington (1986) as células dendríticas intersticiais são distintas das células de Langerhans por serem CD1a negativas. Porém tal reação não apresentou imunomarcção, provavelmente porque a bolsa jugal do hamster possui pouquíssimas células de Langerhans apresentando cinco a 10 vezes menos densidade de superfície de células de Langerhans quando comparados com outros sítios como as costas e orelha do próprio hamster. (BERGSTRESSER, FLETCHER e STREILEIN,1980) A bolsa jugal do hamster é considerada um sítio com tolerância imunológica como consequência da drenagem linfática praticamente ausente, bem como poucas células de Langerhans (BERGSTRESSER, FLETCHER, e STREILEIN,1980; KAPLAN e STREILEIN, 1974). Além disso, Schwartz e colaboradores (1985) demonstraram que existe uma significativa redução da densidade de células de Langerhans após a carcinogênese com DMBA (0,5% em óleo mineral, três vezes semanais) por oito semanas.

Diante disso, utilizou-se o marcador imunistoquímico anti-proteína S-100, uma vez que, segundo Gutkin (2009) a proteína S-100 apresenta-se não somente nos melanócitos basais, como também nas células de Langerhans e células dendríticas intersticiais, embora também identifique no interior desses tecidos, as células de origem neural (feixes de fibras nervosas) e células mioepiteliais. Por este motivo para identificação das células dendríticas S-100+ levou-se em consideração o formato fusiforme ou dendrítico propriamente dito, evitando-se aquelas células em torno de vasos sanguíneos e as próximas a nervos, como descrito na metodologia deste estudo.

Nos grupos controle I e II quimicamente induzidos com o carcinógeno DMBA, a contagem das células dendríticas S-100+ foi ausente no estroma dos tumores. Este resultado está de acordo com Shurin e Lotzer (2009), os quais afirmam que as células dendríticas S-100+ parecem ser poucas ou ausentes na maioria dos carcinomas escamocelulares de cabeça e pescoço tanto de origem mucosa como epidérmica. Este resultado poderia estar relacionado à produção de proteína C reativa pelo carcinoma escamocelular, esta proteína desempenha papel no sistema imune inato e é um conhecido indicador do potencial maligno do tumor. Seus índices elevados estão relacionados a um pior prognóstico do tumor e influenciam as células dendríticas mielóides humanas, interferindo na sua diferenciação, maturação e funções biológicas, bem como diminuem sua migração para dentro do tumor (GOCKEL *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; THOMAS-RUDOLPH *et al.*, 2007; FRENZE *et al.*, 2007; VAN VRÉ *et al.*, 2008; KHANNAVILLI *et al.*, 2009).

Outros mecanismos que poderiam explicar essa escassez de células dendríticas no estroma tumoral são: uma insuficiente quimiotaxia das células dendríticas para o microambiente tumoral e a apoptose das células dendríticas induzida pelo tumor (GUTKIN, 2009). Os diferentes fatores produzidos pelas células do estroma tumoral como VEGF, IL-10, TGF- β , gangliosídeos e outros podem induzir a morte celular por apoptose das células dendríticas e estimular a apoptose espontânea contribuindo para a redução das células dendríticas observada no câncer (UMANSKY e SCHADENDORF, 2009). Wang e colaboradores (2010) relatam aumento na expressão de VEGF em pacientes com carcinoma escamocelular da cavidade oral. Isto representa uma importante razão para o bloqueio da diferenciação e maturação das células dendríticas.

Células dendríticas S-100+ também estavam ausentes no grupo tratado com laser. A ocorrência disso poderia estar relacionada aos efeitos estimulatórios da irradiação laser, desencadeando proliferação celular e em consequência disso aumentando a produção de proteína C reativa, influenciando nas células dendríticas. Além disso, Freitas e colaboradores (2001) encontraram um aumento dos níveis de proteína C reativa em sítios inflamados após a irradiação com laser 1870nm, demonstrando possível influência do laser nos níveis desta proteína. A fotobiomodulação laser também ativa a ATPase e a conversão de ATP em adenosina, que estimula a conversão de óxido nítrico e VEGF (PINHEIRO, BRUGNERA JÚNIOR e ZANIN, 2010), que pode induzir a apoptose das células dendríticas (UMANSKY e SCHADENDORF, 2009).

No grupo tratado apenas com imiquimode foi quantificado um número razoável de células dendríticas S100+ no estroma dos tumores e nas displasias, quando comparado aos demais grupos de estudo. Este resultado favorece a terapia com imiquimode, visto que a ação imunomoduladora deste composto é a atuação em receptores específicos nas células dendríticas (SCHÓN E SCHÓN, 2007; MACÊDO, CARNEIRO e MATAYOSHI, 2007). Uma importante ação do imiquimode é o aumento da eficiência na apresentação de antígeno pela célula dendrítica, induzindo uma resposta imune mais eficiente contra o tumor (HURWITIZ, PINCUS e KUPPER, 2003). Os tumores tratados com imiquimode apresentam diminuição da proliferação celular e exibem aumento da susceptibilidade aos sinais pró-apoptóticos (SIDBURY *et al.*, 2003) porém o modo de ação pró-apoptótico de um modo geral ainda não está completamente esclarecido. A situação *in vivo* é complexa e certamente envolve vários níveis de interação entre múltiplos tipos de células e mediadores os quais devem ser afetados diretamente ou indiretamente pelo imiquimode (SCHÓN e SCHÓN, 2007). Porém houve uma diminuição estatisticamente significativa das células dendríticas S-100+ quando o grupo imiquimode foi comparado com a mucosa normal (Teste de Mann Whitney, $p= 0,0079$).

Segundo Hart (1997), Mclellane e Kämpgen (2000); Keller (2001) após a ativação da resposta imune celular e/ou humoral T-dependente ou independente, a população de células dendríticas, incluindo as células de Langerhans, sofre uma significativa redução em sua quantidade, mediada, provavelmente, por um fenômeno de apoptose.

No nosso estudo o infiltrado inflamatório foi caracterizado como crônico discreto em 76% dos casos. De acordo com Pos e colaboradores (2009) A inflamação associada ao tumor é um fenômeno frequentemente observado e é considerado como uma das mais importantes características da progressão da doença neoplásica. Os processos inflamatórios em torno de tumores malignos são capazes de apoiar ou suprimir a progressão neoplásica em função da fase de progressão do tumor ou das citocinas produzidas no microambiente tumoral. O efeito da inflamação associada à doença maligna sobre as funções das células dendríticas no controle do crescimento tumoral muda continuamente ao longo do tempo, assim como sinais inflamatórios são frequentemente re-interpretados juntamente com a progressão do câncer. No câncer inicial, a inflamação sustenta e apoia a transformação maligna e sobrevivência das células tumorais, no entanto, também permitem o seu reconhecimento por células dendríticas. Na progressão do câncer, a inflamação contribui para a invasão e migração celulares e angiogênese. Além disso, suprime a maturação de células dendríticas, interrompendo a comunicação entre células dendríticas e NK ou células T, também corrompendo respostas imunes antitumorais dos sistemas imune inato e adaptativo. Por outro lado, a estimulação adequada de determinados receptores *toll-like*, pode ativar as células dendríticas com sucesso, levando a reações inflamatórias severas e resultando em rápida rejeição das células tumorais.

É possível que o imiquimode exerça uma ação sobre carcinomas escamocelulares quimicamente induzidos pelo DMBA em bolsa jugal de hamsters. As células dendríticas S-100+ em números reduzidos neste tipo de

neoplasia dificulta a vigilância imunológica do hospedeiro, e o tratamento imiquimode desempenha importante papel no combate ao tumor através da ação imunomoduladora sobre estas células. No entanto a associação do imiquimode com o laser precisa ser melhor investigada.

7 CONCLUSÃO

- O tratamento com Imiquimode demonstrou a presença de lesões displásicas discretas, bem como um aumento do número de células dendríticas S-100+ nas áreas de lesão, e isto poderia significar uma maior ação do sistema imune no combate ao tumor.
- Apesar do tratamento com luz laser ($\lambda 660\text{nm}$), dentro dos parâmetros especificados no presente estudo, demonstrar heterogeneidade quanto à presença de carcinomas escamocelulares incluindo, os pouco diferenciados, esse estudo não foi capaz de demonstrar maior probabilidade do laser em desenvolver estes carcinomas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.; LEITAO, A.; REINA, L.D.C.B., *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

BANCHEREAU, J. *et al.* Dendritic Cells as Vectors for Therapy. **Cell**, Cambridge, v. 106, n. 3, p.271-274, 2001.

BENEDICENTI, S.; PEPE, I.M.; ANGIERO, F.; BENEDICENTI, A.; Intracellular ATP level increases in lymphocytes irradiated with infrared laser light of wavelength 904 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 26, n.5, p. 451-3, 2008.

BERGSTRESSER, P.R.; FLETCHER, C.R.; STREILEIN, J.W. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. **Journal of Investigative Dermatology**, v.74, p. 77-80, 1980.

BERTA, G.; SALAMONE, P.; DI SPRIO, A.; MARINOS, L.; SAPINO, S.; CARLOTTI, M.; CAVALLI, R.; 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- β -cyclodextrin. **Oral Oncology**, v.46, n.1, p. 42-48, 2010.

BOLANHO, A.; CARMO, E.D.; SOUSA F.A.C.G.; CARVALHO, Y.R.; ROSA, L.E.B. Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.34, n.3, p.129-133, 2005.

BUKHARDT PÉREZ, M.P.; RUIZ-VILLAVARDE, R.; DIAZ, M.J.N.; MELGUIZO, J.B.; SINTES, R.N. Basal cell carcinoma: treatment with imiquimod. **International Journal of Dermatology**. v.46, p.539–542, 2007.

CARNEIRO, R.C.; MACEDO, E.M.S.; MATAYOSHI, S. Imiquimod 5% Cream for the Treatment of Periocular Basal Cell Carcinoma. **Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 26, n. 2, 2010.

CARNEVALLI, C. M. M. *et al.* Laser light prevents apoptosis on cho-1 cell line. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p.193-196, 2003.

CARVALHO, M.B. *et al.* Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.3, p. 208-14, 2001.

CASTRO, J. L. F.; PINHEIRO, A. L. B.; WERNECK, C. E.; SOARES, C. P. The effect of laser therapy on the proliferation of oral kb carcinoma cells: an in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**.v.23, p.586-589, 2005.

CHOONTANOM, R.; THANOS, S.; BUSSE, H.; STUPP, T. Treatment of basal cell carcinoma of the eyelids with 5% topical imiquimod: a 3-year follow-up study. **Graefe's Archieve for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.245, n.8, p. 1217-20, 2007.

CHEN,Y. K.; LIN, L. M. Immunohistochemical and mRNA expresion in human oral premalignant and malignant epithelial lesions and DMBA- induced hamster buccal pouch carcinomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**. v.92, p.548-549, 2001.

CLEAIN, S.; MANDREA, E.; PANDREA I.V.; DUFOUR J.; JAPA, S.; VEAZEY, R.S. Immune responses induced by intranasal imiquimod and implications for therapeutics in rhinovirus infections. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.9, n.2, p.457-61, 2005.

DE GIORGI, V., SALVINI, C., CHIARUGI,A.,MAIO, V., NICOLETTI,P.,SANTUCCI, M., CARLI, P., MASSI, D., In vivo characterization of the inflammatory infiltrate andapoptotic status in imiquimod-treated basal cell carcinoma. **International Journal of Dermatology**, v.48, p.312–321, 2009.

DEDIVITIS, R.A.; FRANÇA, C.M.; MAFRA, A.C.B.; GUIMARÃES, F.T.; GUIMARÃES, A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.70, n.1, p. 35-40, 2004.

DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J.A. Dynamics of cytoeskeletal proteins during Fc receptor-mediated phagocytosis in swanson. **Molecular Biology of the Cell**. v.13, p.402-411, 2002.

EBIHARA, A.; KRASIEVA, T. B.; LIAW, L. H. L.; FAGO, S.; MESSADI, D.; OSANN, K. SMITH, P. W. Detection and diagnosis of oral cancer by light-induced fluorescence. **Lasers Surgery Medicine**, v.32, p.17-24, 2003.

FARWELL, D.G.; MEIER, J.D.; PARK, J; COFFMAN, H.; POIRIER B.; PHIPPS, J.; TINLING, S. ENEPEKIDES, D.J; MARCU, L. Time-resolved fluorescence spectroscopy as a diagnostic technique of oral carcinoma: Validation in the hamster buccal pouch model. **Archieves of Otolaryngology - Head & Neck Surgery** v.136, n.2, p.126-33, 2010.

FASSONI, A.A. Carcinogênese bucal química DMBA-induzida: estudo metodológico em hamsters sírios dourados. Bauru, s.n. p.87, 1992.

FESTA NETO, C. Tratamento tópico do carcinoma basocelular superficial e nodular pelo imiquimod creme a 5%: observação de 10 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n.6, p.693-698, 2002.

FLÓREZ, A.; FEAL, C.; DE LA TORRE, C.; CRUCES, C. Invasive squamous cell carcinoma treated with imiquimod 5% cream. **Acta Dermatovenereologica**, v. 34, n.3, p. 227-8, 2004.

FREITAS, A.C.; PINHEIRO, A.L.; MIRANDA, P.; THIERS, F.A.; VIEIRA, A.L. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein levels. **Brazilian Dental Journal**, v.12, n.3, p.187-90, 2001.

FRENZEL, H.; PRIES, R.; BROCKS, C.P.; JABS, W.J.; WITTKOPF, N.; WOLLENBERG, B. Decreased migration of myeloid dendritic cells through increased levels of C-reactive protein. **Anticancer Research**. v. 27, n.6B, p. 4111-5, 2007.

FUJITA, K.; KAKU, T.; SASAKI, M.; ONOÉ, T. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters: tumor characteristics and site of formation. **Journal Dental Research**. v.52, p.1177-1185, 1973.

GALEN, N.; PILCH, B.Z.; SIDRANSKY, D.; EL NAGGAR, A. Epithelial precursor lesions In: WHO classification of tumours. **Head and Neck Tumours**, IARC press, Lyon, 177-179, 2005.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Santos, 2007. 130p.

GIMENEZ-CONTI, B.; SLAGA, T. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 83-90, 2004.

GHIABI, M.; GALLAGHER, G.T.; WONG, D.T.W. Eosinophils, Tissue Eosinophilia, and Eosinophil-derived Transforming Growth Factor α in Hamster Oral Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 52, p. 389-393,1992.

GLUSHKOV, O.V.; NOVOSELOVA, E.G.; CHERENKOV, D.A.; KHRENOY, M.O.; LUNIN, S.M.; CHUDNOVSKII, V.M.; IUSUPOV, V.I.; FESENKO, E.E.; Effects of exposure of different skin areas to low-power laser light. **Biofizika**. v.51, n.1, p. 123-35, p.123-35, 2006.

GOCKEL, I.; DIRKSEN, K.; MESSON, C.M.; JUNGINGER, T.; Significance of preoperative C-reactive protein as a parameter of the perioperative course and long-term prognosis in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.23, p.3746-50,2006.

GULSOY, M.; OZER, G.H.; BOZKULAH, O.; TABAKOGLU, H.O.; DENIZ, G.; ERTAN, C. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on

peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v.82, n.3, p. 199-202, 2006.

GUTIÉRREZ, J.B.; SALSAMENDI, A.L. Fundamentos de ciência toxicológica. Diaz de Santos, Madrid, p.155–177, 2001.

GUTKIN, D.W. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells:The Pathologist's Perspective. In: SHURIN, W.E.; SALTER, E.D. **Dendritic Cells in Cancer**. New York: Springer, 2009. Cap. 3, p. 46.

HART, D. N. J. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Journal of American Society of Hematology**, v. 90, n. 9, p. 3245-3287, 1997.

HASSANIN, M.B.; ASHRAFI, S.H.; DAS, A.K.; Surface ultrastructural changes in chemically induced premalignant lesions in the hamster cheek pouch. **Journal of Oral Pathology**, v.16, p.273-277.

HEADINGTON, J.T., The dermal dendrocyte. In: CALLEN, J.P.; DAHL, M.V.; GOLITZ, L.E.; RASMUSSEN, E.; STEGMEN, J., ed. *Advances in dermatology*. Chicago, Yaerbook Medical Publishers, v.1, p.159-71, 1986.

HENGGE, E.R.; RUZICKA, T. Topical immunomodulation in dermatology: potential of toll-like receptor agonists. **Dermatologic Surgery**, v.30, p.1101-12, 2004.

HOLÍKOVÁ Z.; HERCOGOVA J.; PIZAK J.; *et al.* Dendritic cells in the skin and mucosa: what's news. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.15, n.2, p.116-120, 2001.

HU, W.P.; WANG, J.J.; YU, C.L.; LAN, C.C.; CHEN, G.S.; YU, H.S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n.8, p. 2048-57, 2007.

HUANG, S.J.; HIINEN, D.; MURPHY, G.F.; KUPPER, T.S.; MOLLET, I.G.; SCHANBACHER, C.F.; MILER, D.M.; SCHMULTS, C.D.; CLARK, R.A. Imiquimod enhances IFN-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, n.11, p.2676-85, 2009.

HURWITZ, D.J.; PINCUS, L.; KUPPER, T.S. Imiquimod: a topically applied link between innate and acquired immunity. **Archives of Dermatology**. v.139, n.10, p.1347-50, 2003.

JOBANPUTRA, K.S.; RAJPAL, A.V.; NAGPUR, N. G. Imiquimod. **Indian Journal of Dermatology and Venereology Leprology**, v.72, n. 6, 2006.

KAPLAN, H.J.; STREILEIN, J.W. Do immunologically sites require a functioning spleen? **Nature**. v.251, p.553-554, 1974.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics** QE-23, v.10, p.1703-1717, 1987.

KARU, T. Molecular mechanism of therapeutic effect of low intensity laser irradiation. **Lasers in the Life Science**, Piscataway, v.2, n.1, p.53-74, 1988.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KARU, T. Basics of the action of monochromatic visible and near IR (laser) radiation on cells. 2nd **International Conference on Bioelectromagnetism**, Melbourne AUSTRALIA, 1998.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunology Letters**, v.78, p.113-122, 2001.

KHANDAVILLI, S.D.; CEALLAIGH, P.O.; LLOYD, C.J.; WHITAKER, R. Serum C-reactive protein as a prognostic indicator in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.45, n.10, p.912-4, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.;FAUSTO, N.; MITCHEL, R.N. Robbins Patologia Básica. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2008.

LAJOLO, C.; SGAMBATO, A.; MAIORANO, E.; LUCCHESI, A.; CAPODIFERRO, S.; FAVIA, G.; GIULIANI, M. Calcium Glucarate Inhibits DMBA-induced Oral Carcinogenesis in the Hamster: Histomorphometric Evaluation. **Anticancer Research**, v.30, p.843-849, 2010.

LEE, J.R.; SHIN, J.H.; PARK, J.H.; SONG, S.U.; CHOI, G.S. Combined treatment with intratumoral injection of dendritic cells and topical application of imiquimod for murine melanoma. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.32, p.541–549, 2007.

LESIMPLE, T.; NEIDHARD, E.M.; VIGNARD, V.; LEFEUVRE, C.; ADAMSKI, H.; LABARRIERE, N.; CARSIN, A.; MONNIER, D.; COLLET, B.; CLAPISSON, G.; BIREBENT, B.; PHILIP, I.; TOUJAS, L.; CHOKRI, M.; QUILLIEN, V. Immunologic and clinical effects of injecting mature peptide-loaded dendritic cells by intralymphatic and intranodal routes in metastatic melanoma patients. **Clinical Cancer Research**, v.12, n.24, p.7380-8, 2006.

LI N.; CHEN X.; LINO J.; YANG G.; WANG S.; YOUSSEF J.; HAN C.; CHEN J.; HUANG M.; YANG C. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. **Carcinogenesis**, v. 23, n.8, p. 1307-1313, 2002.

LIEBOW, C.; CREAN, D.H.; LEE, M.T.; KAMER, A.R.; MANG, T.S.SCHALLY, A.V. Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. **Proceedings of the National Academy of Science USA** v.91, p.3804-3808, 1994.

LIMA, H.C. Imunologia clínica dos imunomoduladores. In: Lima H.C., **Tópicos em Imunodermatologia Clínica**. São Paulo: Segmento Farma; 2004, p.121-32.

LIMA, H.C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.3, p. 207-21, 2007.

LIN, L.M.; CHEN, Y.K.; LAI, Y.L.; CHEN H.R. Cancer-promoting effect of Taiwan betel quid in hamster buccal pouch carcinogenesis. **Oral Diseases**. v.3, p.232-235, 1997.

LIU, G.; BLACK, K.L.; YU, J.S. Sensitization of malignant glioma to chemotherapy through dendritic cell vaccination. **Expert Review of Vaccines**, v.5, n.2, p. 233-47, 2006.

LIU, Y.H; CHENG, C.C.; HO, C.C.; PEL, R.J.; YEH, K.T.; CHAN, Y.; LAL, Y.S. Effects of diode 808 nm GaAlAs low-power laser irradiation on inhibition of the proliferation of human hepatoma cells in vitro and their possible mechanism. **Research Communications of Molecular Pathology & Pharmacology**, v. 115-116, p. 185-201, 2004.

LOVE, W.E.; BERNHARD, J.D.; BORDEAUX, J.S. Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. **Archives of Dermatology**, v.145, n.12, p.1431-8, 2009.

LONSDALE-ECCLES, A.A.; MORGAN, J.M.; NAGARAJAN, S. et al. Successful treatment of vulval melanoma in situ with topical 5% imiquimode cream. **British Journal of Dermatology**, v.155, p.215-17, 2006.

LUTZ, W.K. A true threshold dose in chemical carcinogenesis cannot be defined for a population, irrespective of the mode of action. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, p.566-568, 2000.

MACDONALD, D. G.; SHEPHERD, D. E.; CRITCHLOW, H. A. Influence of partial excision of carcinogen treated hamster cheek pouch on subsequent tumour development. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.24, p.342-348, 1986

MACDONALD, D. G.; CRITCHLOW, H. A. Effect of 2 episodes of cryosurgery on carcinogen-treated hamster cheek pouch. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.16, p.90-94, 1987.

MACEDO, E.M.S., CARNEIRO, R.C.; MATAYOSHI, S. New approach to periocular basal cell carcinoma treatment: imiquimod. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v.66, n.6, p. 363-428, 2007.

MACEJOVÁ, D.; BRATKO, J., Chemically induced carcinogenesis: A comparison of 1 methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitrosamine e azoxymethane models (minireview). **Endocrine regulations**, v.35, p.53-59, 2001.

MARTI, L.C. A influência do fator de crescimento endothelial vascular, na maturação “*in vitro*” de células dendríticas derivadas de monócitos. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, 2008.

MARTÍN-GARCIA, R.F. Imiquimod: an effective alternative for the treatment of invasive cutaneous squamous cell carcinoma. **Dermatologic Surgery**, v.31, n.3, p. 371-4, 2005.

MAS, J.R. Bioenergia e propriedades ópticas dos tecidos. In: PINHEIRO, A.L.B., BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**, São Paulo: Editora Santos, 2010. Cap.4, p.65-76.

MCLELLAN, A. D.; KÄMPGEN, E. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. **Immunology Letters**, v. 72, p. 101-105, 2000.

MIKAIL, S. LASER terapêutico. IN: MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia veterinária**, 2.ed. São Paulo: Editora Manole, 2009, p. 81-90.

MILLER, R.L.; GERSTER, J.F.; OWENS, M.L., et al. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. **International Journal of Immunopharmacology**, v.21, p.1-14, 1999.

MOGNATO, M.; SUIZZATO, F.; FACCHIN, F.; ZAGHETTO, L.; CORTI, L. Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, n.6, p. 523-6, 2004.

MONTEIRO, J.S.C.; ACIOLE, G.T.S.; CANGUSSU, M.C.T.; SANTOS, J.N.; PINHEIRO, A.L.B. Effects of visible or IR Laser light on the progression of chemo-induced oral dysplasia: In vivo study on the hamster cheek pouch model. **Proceedings of SPIE 7165**, 71650D, 6 pages, 2009.

MORRIS, A.L. Factors Influencing Experimental Carcinogenesis in the Hamster Cheek Pouch. **Journal of Dental Research**, v.40, p.3-15, 1961.

NADAL S.R.; CALORE E.E.; CRUZ S.H.A.; HORTA S.H.C.; MANZIONE C.R.; BIN F.C.; CAPELHUCHNIK P.; KLUG, W.A. Comparação das Contagens das Células de Langerhans de Tecidos Contendo Carcinoma Anal em Doentes com

e sem Infecção pelo HIV. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.26, p.3, p.269-274, 2006.

NAVI, D.; HUNTLEY, A., Creme de imiquimod a 5% e o tratamento de malignidade cutânea. **Dermatology Online Journal**, v.10, n.1, p.4, 2004.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia Oral e Maxilofacial. **Editora Saunders Elsevier**, 3ª edição. 2009.

NOURI, K.; O'CONNELL, C.; RIVAS, M.P.; Imiquimod for the treatment of Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma. **Journal of Drugs in Dermatology**. v. 2, n.6, p. 669-73, 2003.

NOVOSELOVA, E.G.; GLUSHKOVA, O.V.; CHERENKOV, D.A.; CHUDNOVSKY, V.M.; FESENKO, E.E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**. v.22, p.33–38, 2006a.

NOVOSELOVA, E.G.; CHERENKOV, D.A.; GLUSHKOVA, O.V.; NOVOSELOVA, T.V.; CHUDNOVSKI, V.M.; IUSUPOV, V.I.; FESENKO, E.E. Effect of low-intensity laser radiation (632.8 nm) on immune cells isolated from mice. **Biofizika**. v.51, n.3, p. 509-18, 2006b.

OCAÑA-QUERO, J.M.; LASTRA, P.; GOMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLÁN, M. Biological Effect of Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Mouse Myeloma (Sp2-Ag14) Cell Line In Vitro. **Lasers Medical Science**. v.13, n.3, p. 214-218, 1998.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L.F.; LOPES, C. Chemical Carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.79, n.4, p. 593-616, 2007.

PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, D.T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L.P. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 73, n.4, p. 339-344, 2007.

PINHEIRO, A.L.B.; CAVALCANTI, E.T.; PINHEIRO, T.I.N.R.; ALVES, M.J.P.C.; MIRANDA, E.R.; QUEVEDO, A.S.; MANZI, C.T.; VIEIRA, A.L.B.; ROLIM, A.B. Non surgical laser treatment (NSLT) in the management of disorders of the maxillofacial region. **Journal of Clinical Laser Medicine Surgery**. v.15, p.181-3, 1998.

PINHEIRO, A.L.B.; NASCIMENTO, S.C.; VIEIRA, A.L.B.; ROLIM, A.B.; SILVA, P.S.; BRUGNERA Jr, A. Does LLLT Stimulate Laryngeal Carcinoma Cells? An In Vitro Study. **Brazilian Dental Journal**, v.13, n.2, p.109-112, 2002.

PINHEIRO, A.L.B., BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo: Editora Santos, 2010, 428 p

PONTE, P.; SERRÃO, V.; FIADEIRO, T.; Focal epithelial hyperplasia (Heck's Disease) in two siblings: response to treatment with imiquimod 5% cream. **European Journal of Dermatology**, v.20, n.2, p.248-9, 2010.

POS, Z.; SABATINO, M.; SPIVEY, T.; LIU, H.; FALUS, A.; MARINCOLA, F.M. Tumor-Associated Inflammation and Impact on Dendritic Cell Function. In:

POSPISIL, O. A.; MACDONALD, D.G. The tumour potentiating effect of cryosurgery on carcinogen treated hamster cheek pouch. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.19, p.96-104, 1981.

QUATRESOOZ, P.; PIÉRARD, G.E.; Imiquimod-responsive basal cell carcinomas and factor XIIIa-enriched dendrocytes. **Clinical and Experimental Dermatology**. v.28, p. 27–29, 2004.

REINHARD, G.; MARTEN, A.; KISKE, S.M.; FEIL, F.; BIEBER, T.; SCHMIDT, W. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. **British Journal of Cancer**. v.86, n.10, p. 1529-33, 2002.

RUIZ-VILLAVERDE, R.; SÁNCHEZ-CANO, D.; BURKHARDT-PÉREZ, P. Superficial basal cell carcinoma treated with imiquimod 5% topical cream for a 4-week period: a case series. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.23, n.7, p.828-31, jul., 2009.

RYBKA, M.O.; CINTRA, M.L.; SOUZA, E.M.; METZE, K. Density of dendritic cells around basal cell carcinomas is related to tumor size, anatomical site and stromal characteristics, and might be responsible for the response to topical therapy. **International Journal of Dermatology**. v.47, p.1240–1244, 2008.

SALLEY J.J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **Journal Dental Research**, v.33, p.253-62, 1954.

SANTELLA, R.M.; GAMMON, M.; TERRY, M.; SENIE, R.; SHEN, J.; KENNEDY, D.; AGRAWAL, M.; FARAGLIA, B.; ZHANG, F. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. **Mutation Research**, v.592, p.29–35, 2005.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 4, p. 239-51, 2001.

SCHINDL, A. et al. Low intensity laser therapy: a review. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 48, n. 5, p. 312-326, 2000.

SCHAFFER, M.; SROKA, R.; FUCHS, C.; SCHRADER-REICHARDT, U.; SCHAFFER, P.M.; BUSCH, M.; DÜHMKE, E. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v.40, n.3, p.253-257, 1997.

SCHÖN, M.P.; SCHÖN, M. Imiquimod: mode of action. **British Journal of Dermatology**, v.157 (suppl. 2), p. 8-13, 2007.

SCHÖN, M.P., SCHÖN, M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. **Apoptosis**. v.9, n.3, p.291-8, 2004.

SHURIN, W.E.; SALTER, E.D. **Dendritic Cells in Cancer**. New York: Springer, 2009. Cap. 11, p. 157-170.

SCHWARTZ, J. ODUKOYA, O.; STOUFI, E.; SHKLAR, G. Alpha Tocopherol Alters the Distribution of Langerhans Cells in DMBA-treated Hamster Cheek Pouch Epithelium. **Journal of Dental Research**. v. 64, p. 117-121, 1985. KLIGMAN, D.; HILT, D.C. The S-100 protein family. **Trends in Biochemical Science**, v. 13, p. 437-43, 1988.

SCHWARTZ, J. L.; GU, X.; KITTLES, R. A.; BAPTISTE, A.; SHKLAR, G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. **Oral Oncology**. v.11 , p. 225-235, 2000.

SHURIN, M.R.; LOTZE, M.T. Dendritic Cells in Cancer: Emergence of the Discipline. In: SHURIN, W.E.; SALTER, E.D. **Dendritic Cells in Cancer**. New York: Springer, 2009. Cap. 2, p. 15.

SIDBURY, R.; NEUSCHLER, N.; NEUSCHLER, E.; *et al.* Topically applied imiquimod inhibits vascular tumor growth in vivo. **Jornal of Investigative Dermatology**. v. 121, p. 1205–1209, 2003.

SILVEIRA JÚNIOR, L.; PALECKIS, L. G. P.; NICOLAU, R. A.; BUSANELLO, R. Z.; MARDEGAN, D. A.; FONSCECA, S. M.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T. Detection of induced neoplastic lesions in the oral mucosa of hamsters using fluorescence spectroscopy. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.50, n.3, p. 302-304, 2004.

SINGH,S.; BUNKER, C.B.; Squamous cell carcinoma on the scalp following treatment with 5% imiquimod cream. **Clinical Experimental Dermatology**, v.32, n.5, p.594-5, 2007.

SMITH, K.J.; HAMZA, S.; SKELTON, H. Topical imidazoquinoline therapy of cutaneous squamous cell carcinoma polarizes lymphoid and monocyte/macrophage populations to a Th1 and M1 cytokine pattern. **Clinical Experimental Dermatology**, v.29, n.5, p.505-12, 2004.

SOMMER, A.P.; ZHU, D.; SCHARNWEBER, T. Extraordinary Anticancer Effect of Green Tea and Red Light. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.28, n. 3, p.1-2, 2010,

SPIETH, K.; KOVACS, A.; WALTER M.; BUG, R.; KAUFMANN, R.; GILLE, J. Topical imiquimod: effectiveness in intraepithelial melanoma of oral mucosa. **Lancet Oncology**, v.7, p.1036-37, 2006.

SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T.; SCHRADER-REICHARDT, U.; BUSCH, M.; SCHAFFER, P.M.; DÜHMKE, E.; BAUMGARTNER, R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers and Surgery Medicine**. v.25, p. 263-271, 1999.

STANLEY, M.A. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. **Clinical Experimental Dermatology**, v.27, p.571-7, 2002.

STEINMAN R.M. Some interfaces of dendritic cell biology. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.111, n.7-8, p. 675-97, 2003.

SUND, S.E.; AXELROD, D. (2000) Actin dynamics at the living cell submembrane imaged by total internal reflection fluorescence photobleaching. **Biophysics Journal**, v.79, p.1655-1669.

THOMAS- RUDOLF, D.; DU CLOS, T.W; SNAPPER, C.M.; MOLD, C. C-reactive protein enhances immunity to Streptococcus pneumoniae by targeting uptake to Fc gamma R on dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v.178, n.11, p.7283-91, 2007.

TILLMAN, D.K.Jr; CARROLL, M.T. Topical imiquimod therapy for basal and squamous cell carcinomas: a clinical experience. **Cutis**. v.79, n.3, p.241-8, 2007.

UMANSKY, V.; SCHADENDORF, D. Elimination of Dendritic Cells in Cancer. In: SHURIN, W.E.; SALTER, E.D. **Dendritic Cells in Cancer**. New York: Springer, 2009. Cap. 6, p. 89-99.

VAN VRÉ, E.A.; BULT, H.; HOYMANS, V.Y.; VAN TENDELGO, V.F.; VRINTS, C.F.; BOSMANS, J.M. Human C-reactive protein activates monocyte-derived dendritic cells and induces dendritic cell-mediated T-cell activation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.28, n.3, p.511-8, 2008.

VIDAL, D.; MATIAS-GUIU, X.; ALOMAR, A. Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki-67, p53, and basal cell carcinoma apoptosis. **British Journal of Dermatology**, v.151, p.656-62, 2004.

WANG, Z.Y.; SHI, P.H.; HUANG, X.F.; HUA, Z.C.; HOU, Y.Y.; HAN, W.; HU, Q.G. Peripheral blood dendritic cells and vascular endothelial growth factor in

oral squamous cell carcinoma: correlation analysis and in vitro study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n.7, p.713-20, 2010.

WARSHAUER, E.; WARSHAUER, B.L Clearance of basal cell and superficial squamous cell carcinomas after imiquimod therapy. **Journal of Drugs in Dermatology**, v.5, p. 447-51, 2008.

WASIK, M.; GORSKA, E.; MODZELEWSKA, M.; NOWICKI, K.; JAKUBCZAK, B.; DEMKOW, U. The influence of low-power helium-neon laser irradiation on function of selected peripheral blood cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.58 Suppl 5 (Pt 2), p.729-37, 2007.

WERNECK, C. E.; PINHEIRO, A. L. B.; PACHECO, M. T. T.; SOARES, C. P.; CASTRO, J. L. F. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.23, p.300-303, 2005.

WIWANITKIT, V. Imiquimod: a new immunomodulatory drug. **Chulalongkorn Medical Journal**, v.48, n.5, p. 325 – 38, 2004.

WOOTEN, J. M. Imiquimod. **Southern Medical Journal**. v. 98, n. 9, p. 852, sep., 2005.

XU, Y.; QIU, Y.; NA, Z.; YANG, F.; Role of the Chinese Herbal Medicine Xianhuayin on the Reversal of Premalignant Mucosal Lesions in the Golden Hamster Buccal Pouch **International Journal of Oral Science**. v.2, n.1, p. 53–58, 2010.

YANG, Y., ZHOU, Z. T., GE, J. P. Effect of genistein on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster. **Carcinogenesis**, v. 27, no. 3, p. 578-583, 2006.

YASAR, S.; MANSUR, A.T.; SERDAR, Z.A.; GOKTAY, F.; ASLAN, C. Treatment of Focal Epithelial Hyperplasia with Topical Imiquimod: Report of Three Cases. **Pediatric Dermatology**. v. 26, n. 4, p. 465–468, 2009.

YU, T.; WANG, X.; GONG, R.; LI, A.; YANG, S.; CAO, Y. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethyl benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.28, n. 64, p. 1-10, 2009.

ZHANG, R.; BECNEL, L.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. C-reactive protein impairs human CD14+ monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function. **European Journal of Immunology**, v. 36, n.11, p.2993-3006, 2006.

3M PHARMACEUTICALS. Full prescribing information for Aldara™ (imiquimod), St. Paul, MN, March 1997.

APÊNCIDE A – Protocolo utilizado na imunohistoquímica

O protocolo utilizado para a realização da imunohistoquímica constou de:

- 1) Desparafinização.
- 2) Hidratação.
- 3) Bloqueio da Peroxidase Endógena utilizando álcool metílico (Reagente analíticos Dinâmica[®], SP, Brasil) e água oxigenada - H₂O₂ (20 volumes - LBS[®], SP, Brasil) em dois banhos de 15' na temperatura ambiente (TA).
- 4) Incubação do Anticorpo primário S-100 por 30' em TA.
- 5) Aplicação do Sistema EnVision incubado por 30' em TA.
- 6) Aplicação do Diaminobenzidina (DAB), incubado por 10' em TA
- 7) Contra coloração - Hematoxilina de Meyers por 10'.
- 8) Desidratação
- 9) Montagem das lâminas com auxílio da máquina Tissue-tek[®] SCA – Sakura (Sakura Finetek, Tokio, Japão).

ANEXO A - Certificado de aprovação no Comitê de ética em experimentação animal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Canela
 CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 336-5976
 Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa "AÇÃO 1-(2-METILPROPIL)-1-H-IMIDAZOL[4,5-C]QUINOLINA-AMINA (MIQUIMOD)E DO LASER NO TRATAMENTO DE CÂNCER QUIMICAMENTE INDUZIDO EM MUCOSA ORAL DE HAMISTERS - ESTUDO HISTOLÓGICO COM INVESTIGAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS - 05/08" de autoria de JEAN NUNES DOS SANTOS, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 03 de Junho de 2008


Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro
 Presidente - CEEA

*Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro, PhD
 Mat. 1749908
 Presidente - CEEA*