

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

PAULO HENRIQUE AZEVEDO DE HOLANDA CAVALCANTI

EFEITOS DO LASER λ 808 nm EM BAIXA INTENSIDADE

E DO IMIQUIMODE EM CARCINOMAS ORAIS

QUIMICAMENTE INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS:

ESTUDO HISTOLÓGICO

RECIFE

2014

PAULO HENRIQUE AZEVEDO DE HOLANDA CAVALCANTI

EFEITOS DO LASER $\lambda 808\text{nm}$ EM BAIXA INTENSIDADE
E DO IMIQUIMODE EM CARCINOMAS ORAIS
QUIMICAMENTE INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS:
ESTUDO HISTOLÓGICO

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

RECIFE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C376e Cavalcanti, Paulo Henrique Azevedo de Holanda.
Efeitos do laser $\lambda 808$ nm em baixa intensidade e do imiquimode em
carcinomas orais quimicamente induzidos em camundongos: estudo
histológico / Paulo Henrique Azevedo de Holanda Cavalcanti. – Recife:
O Autor, 2014.
71 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Jurema Freire Lisboa de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Terapia a laser. 2. Carcinogênese. 3. Imiquimode. 4. Carcinoma. I.
Castro, Jurema Freire Lisboa de (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2015-211)

EFEITOS DO LASER λ 808 EM BAIXA INTENSIDADE E DO IMIQUIMODE EM
CARCINOMAS ORAIS QUIMICAMENTE INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS:
ESTUDO HISTOLÓGICO

PAULO HENRIQUE AZEVEDO DE HOLANDA CAVALCANTI

TESE APROVADA EM 28 DE AGOSTO DE 2014

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. ALESSANDRA ALBUQUERQUE TAVARES DE CARVALHO

Prof^o. Dr. CARLOS FREDERICO DE MORAES SARMENTO

Prof^a. Dr^a. FABIANA MOURA DA MOTTA SILVEIRA

Prof^a. Dr^a. CLAUDIA CAZAL LIRA

Prof^a. Dr^a. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO

RECIFE – PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Profº. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profº. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Profº. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADORA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profª. Drª. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

Profª. Drª. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Profº. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Profº. Dr. Arnaldo França de Caldas Junior

Profº Drº Carlos Menezes Aguiar

Profº. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profª. Drª. Flávia Maria de Moraes Ramos Perez

Profº. Dr. Jair Carneiro Leão

Profª. Drª. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profª. Drª. Liriane Baratella Evêncio

Profº. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Profª. Drª. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Profº. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profª. Drª. Renata Cimões Jovino Siveira

Profª. Drª. Silvia Regina Jamelli

Profª. Drª. Simone Guimarães Farias Gomes

Profº. Dr. Tibério Cesar Uchoa Matheus

MEMBROS COLABORADORES

Profº. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profª. Drª. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Agradecimentos Especiais

A DEUS,

Início, meio e fim.

Agradeço pelo dom da vida...

Ao meu pai, **Márcio Landaval de Holanda Cavalcanti** e minha mãe, **Ana Lúcia Azevedo de Holanda Cavalcanti**, pelo exemplo a ser seguido, pela minha formação, por tudo! Mas, principalmente, pelo amor.

A minha esposa **Joise Viana Galvão Cavalcanti**, a **Déborah e Natália Galvão Cavalcanti**, minhas filhas queridas, pelo apoio, incentivo, paciência e compreensão durante todo o período de realização do Curso de Doutorado.

Agradecimentos

Ao Reitor da Universidade Federal de Pernambuco, **Profº. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado**.

Ao Vice-Reitor **Profº. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques**.

Ao Pro-Reitor **Profº. Dr. Francisco de Souza Ramos**.

Ao Diretor do Centro de Ciências da Saúde **Profº. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho**.

A Coordenadora da Pós-Graduação em Odontologia **Profª. Drª. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho**.

A **Profª. Drª. Jurema Freire Lisboa de Castro**, pela confiança, paciência, dedicação e entusiasmo na orientação deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez**, pela valorosa contribuição a este trabalho e a captura das imagens microscópicas.

Ao **Profº Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida**, pelas orientações e atenção no biotério.

Ao **Profº. Dr. Carlos Frederico de Moraes Sarmiento**, pela amizade e incentivo para realização deste Curso de Doutorado.

Ao **Sr. Jansen Dodô da Silva Campos**, pela análise estatística.

A colega **Doutoranda Roberta Natalie de Andrade Santos** pela inestimável colaboração, empenho e disposição.

A todos os **Professores** do Curso de Doutorado, pela seriedade e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de Curso, **Andreza Barkokebas Santos de Faria, Breno Delano Salviano de Oliveira, Bruna de Carvalho Farias, Catarina da Mota Vasconcelos Brasil, Claudia Cristina Brainer de Oliveira Mota, Daene Patricia Tenorio Salvador da Costa, Elvia Christina Barros de Almeida, Felipe Bravo Machado de Andrade, Gilberto Cunha de Souza Filho, Igor Henrique Moraes Silva, Irani de Farias Cunha Júnior, Leogenes Maia Santiago e Leonardo Cavalcanti Bezerra dos Santos, Talita Ribeiro Tenorio de França**, pelo convívio alegre e saudável.

Ao **Sr. Rogério Clericuzi**, pela preparação das lâminas e ajuda no laboratório.

A **Sra. Oziclere Sena**, secretária da Pós-Graduação pela constante disposição em ajudar com alegria.

A todos os **Funcionários** da Pós-Graduação em Odontologia e do Biotério de Antibióticos da Universidade Federal de Odontologia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O imiquimode é uma droga imunomoduladora que tem sido empregada no tratamento de neoplasias cutâneas. Sua ação em carcinoma oral não está bem definida. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do imiquimode, associado ou não ao LASER de baixa intensidade $\lambda(808\text{nm})$, em carcinomas orais induzidos quimicamente em camundongos. Vinte animais foram induzidos a carcinogênese através do N-óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) na água de beber. Após 16 semanas, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com cinco camundongos cada. Os animais do grupo 1 (controle positivo) não receberam intervenção. No grupo 2 (Laser) os animais foram irradiados com LASER de baixa intensidade ($\lambda 808\text{nm}$), 12 aplicações em dias alternados. No grupo 3 (imiquimode) os animais receberam 12 aplicações de imiquimode creme em dias alternados. Já os animais do grupo 4 receberam as 12 aplicações do imiquimode seguidas da irradiação com o LASER. Ao final do tratamento os animais foram submetidos a eutanásia e as amostras encaminhadas para estudo histológico através de microscopia. Os resultados demonstraram a presença de tumores malignos em todos os grupos, tendo o G3 os maiores índices 100% e o G1, G2 e G4 60%. Além disso, segundo o grau histológico, o G3 apresentou diferença estatisticamente significativa superior ao G1 ($p=0,022$). Neste trabalho, o tratamento com imiquimode potencializou o desenvolvimento dos carcinomas e o LASER estimulou a proliferação de células malignas. A associação do imiquimode com o LASER necessita de maiores investigações futuras.

Palavras-chave: Terapia a laser. Carcinogênese. Imiquimode. Carcinoma.

ABSTRACT

Imiquimod is a drug used in cutaneous neoplasms treatment. Its mechanism of action in oral carcinoma is not well defined. The aims of this study were to evaluate the potential of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to induce cancer, as well as, to investigate the effects of imiquimod and laser treatments applied to such lesions. 20 mice were randomly divided into four groups (n=5) and cancerous lesions induced with a 4NQO in drink water solution. In Group 1 mice (control) lesions were not subjected to any form of treatment. In Group 2, the laser group, lesions were irradiated with a low density laser beam (λ 808nm) following the same protocol used for group 2. In Group 3, they were treated with 12 applications of imiquimod cream, administered locally on alternate days. In Group 4 mice, lesions were initially treated with imiquimod (12 applications) followed by laser irradiation. 2 days post-treatment, the mice were euthanized, dissected and tissue samples subjected to histological analysis by optical microscopy. The presence of malignant lesions was observed in all groups with a higher prevalence in Group 3 (100%) followed by Groups 1, 3 and 4 (60%). The 4NQO was effective in induce experimental oral carcinogenesis. Also, when compared to those of Group 1, Group 3 lesions were also of a higher histological grade ($p=0.022$). These results suggest both that imiquimod does not reduce the occurrence of SCCs and that laser treatment increased malignant cell proliferation. Additional studies are needed for further clarification of the effects of combined imiquimod /laser treatment.

KEYWORDS: Lasertherapy. Carcinogenesis. Imiquimod. Carcinoma.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual dos animais por grupo segundo o grau do infiltrado inflamatório.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais

Tabela 2 - Parâmetros e configurações do aparelho LASER

Tabela 3 - Resultados da graduação histológica e do infiltrado inflamatório por grupo e em cada animal

Tabela 4- Distribuição percentual por grupos segundo o grau e infiltrado inflamatório

Tabela 5 - Prevalência das lesões

Tabela 6 - Percentis do grau histológico segundo o grupo

Tabela 7 - Percentual dos animais por grupo segundo o grau do infiltrado inflamatório

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imiquimode

FIGURA 2 - Manipulação do animal durante a intervenção

FIGURA 3 - Aparelho LASER

FIGURA 4 - Configurações no display

FIGURA 5- Fotomicrografia – displasia leve do grupo imiquimode e LASER

FIGURA 6- Fotomicrografia – displasia severa do grupo imiquimode

FIGURA 7 -Fotomicrografia – carcinoma *in situ* do grupo imiquimode

FIGURA 8 -Fotomicrografia - CCE do grupo imiquimode

FIGURA 9 -Fotomicrografia - carcinoma bem diferenciado do grupo controle positivo

FIGURA 10- Fotomicrografia - carcinoma invasivo do grupo imiquimode e LASER

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
CCE	Carcinoma de células escamosas
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina-eosina
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
nm	Nanômetro
nº	Número
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
λ	Comprimento de onda
µg/ml	Micrograma por mililitro
µm	Micrometro
4NQO	N-óxido de 4-nitroquinoleína

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MÉTODOS.....	19
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
4.1 CARCINOGENESE.....	28
4.2 IMIQUIMODE.....	29
4.3 LASER.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE – ARTIGO.....	40
Folha de rosto.....	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Materiais e Métodos.....	45
Resultados.....	47
Discussão.....	55
Conclusão.....	57
Referências.....	58
ANEXOS.....	61
ANEXO A – Parecer do Comissão de Ética.....	62
ANEXO B – Normas da revista.....	63

1 INTRODUÇÃO

O modelo de indução química de carcinomas em línguas de camundongos através da utilização do N-ÓXIDO DE 4-NITROQUINOLEÍNA (4NQO) tem se mostrado efetivo para o estudo da carcinogênese (EDITORIAL REVIEW, 2005; KANOJIA e VAYDIA, 2006). O 4NQO exerce uma ação oxidativa no núcleo celular, levando a alterações no seu DNA, semelhante aos danos que são provocados pelo tabaco, um comprovado fator de risco para o câncer oral (VERED *et al* 2007).

Os estágios sequenciais da carcinogênese, hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma de células escamosas (CCE) são induzidos pelo 4QNO. Além disso, são produzidas alterações moleculares e histológicas como visto na carcinogênese oral humana (SUSUKI *et al* 2006).

O imiquimode (1 - (2-metilpropil)-1-H-imidazol[4,5-c]quinolona-amina) é um composto sintético capaz de ativar as células do sistema imunológico, ajudando a controlar os vírus, tumores, e parasitas intracelulares (STANLEY, 2002). Possui ação imunomoduladora com atividade anti-câncer (JOBANPUTRA *et al* 2006; CORREA *et al.*, 2009), além das reconhecidas propriedades pró-apoptótica e imunomoduladora (SCHON e SCHON, 2007).

Algumas evidências apontam que a influência do imiquimode na apoptose celular vem da modulação de transdutores de sinais e ativadores de transcrição e sinalização, que contribuem para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que podem estar envolvidas na apoptose celular (BOTTRELL *et al.* 1999). Em adição, a aplicação do imiquimode *in vivo*, levou ao aumento da expressão de receptores de morte celular e à diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (DE GIORGI *et al*, 2009).

Foi demonstrado que o LASER de baixa intensidade estimula a atividade de células efetivas na resposta imune *in vitro*. Entretanto a influência desse estímulo em modelo animal ainda não está bem definido (NOVOSELOVA *et al*, 2006). Os fotorreceptores celulares que fazem parte da cadeia respiratória podem ser estimulados ou inibidos pelos fótons da luz LASER, determinando assim a magnitude da proliferação celular. Evidências demonstram que o LASER atua tanto

em células não neoplásicas como em células neoplásicas, e que a proliferação celular pode ser estimulada dependendo dos parâmetros de utilização do LASER. Uma dose fora dos padrões pode oferecer um resultado negativo, não estimulatório ou mesmo inibitório (CARNEVALLI *et al.*, 2003).

Em estudos anteriores realizados *in vitro*, foram comprovados os efeitos estimuladores do LASER de baixa intensidade, comprimento de onda (λ) 685 nm, na proliferação celular em cultura de células KB (CASTRO *et al* 2005 e WERNECK *et al* 2005)

Efeitos fotobiomodulatórios do LASER de baixa intensidade já foram determinados em diversos clones celulares, malignos ou não, porém, a maioria desses estudos se deu em cultura de células (PINHEIRO *et al*, 2002) o que não reflete a realidade da complexa biologia do câncer. O imiquimode possui reconhecida ação apoptótica (DE GIORGI *et al*, 2009), porém, ainda são escassos os estudos que dissertem sobre sua utilização no câncer de cavidade oral (MONTEIRO *et al*, 2011). Assim sendo, tanto o LASER de baixa intensidade, como o imiquimode, podem ser investigados como moduladores da resposta imune em carcinomas orais *in vivo*, em modelo animal. Desta forma, este estudo visa avaliar os efeitos do LASER de baixa intensidade e do imiquimode em carcinomas orais quimicamente induzidos pelo 4NQO em língua de camundongos, através de estudo histológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do LASER de baixa intensidade ($\lambda 808\text{nm}$) e do imiquimode em carcinomas orais quimicamente induzidos pelo 4NQO.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar os graus de indução carcinogênica do 4NQO em mucosa oral de modelo animal através da avaliação microscópica;

- Avaliar o potencial de ação do Laser ($\lambda 808\text{nm}$), do imiquimode e da associação imiquimode/Laser na mucosa oral de camundongos albinos submetidos a carcinogênese química pelo 4NQO, através da microscopia.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Os procedimentos necessários para a realização desta pesquisa foram analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 23076.051247/2012-58, obtendo parecer favorável (Anexo A).

Foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos. Os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), especialmente a Lei 11.794.

3.2 Localização do Estudo

Esta pesquisa foi realizada no biotério do Departamento de Antibióticos e no laboratório da disciplina de Patologia Oral do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, ambos na Universidade Federal de Pernambuco.

3.3 Tipo de estudo

No presente estudo os animais foram alocados nos grupos experimentais de forma aleatória, caracterizando um estudo experimental controlado *in vivo*.

3.4 Caracterização e manipulação da amostra

Foram incluídos nesta pesquisa um total de 20 camundongos albinos *Swiss* isogênicos, machos, com 6 semanas de idade e pesando entre 32 e 45 gramas (CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2012) oriundos do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no qual os animais foram mantidos e submetidos a todos os procedimentos de intervenção.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno grande com 45 x 30 x 12 cm de dimensão, atapetada com maravalha, e mantidas em estantes de aço inoxidável, com espaços de 2cm entre as gaiolas e protegidos de luminosidade direta. Durante todo o experimento os animais receberam água e ração sólida peletizada (Labina® - Purina Nutrimentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com alto teor de proteína (20 a 27%) *ad libitum*. As trocas de maravalha, limpeza de

gaiolas, bebedouros e comedouros foram efetuadas três vezes por semana, segundo o protocolo de limpeza e desinfecção do biotério.

Os animais ficaram sempre sob temperatura controlada $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados entre 09 e 15 horas.

3.5 Indução da carcinogênese

O método escolhido para indução dos tumores na língua dos animais foi a administração do carcinógeno 4NQO 98% (Laboratório Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na água de beber (KANOJIA; VAIDYA, 2006). O carcinógeno foi pesado em balança de precisão (Eletronic Balance FA-2104N BIOPRECISA) e diluído em água, na concentração de 100 µg/ml. As soluções foram preparadas e trocadas semanalmente, colocadas em garrafas envoltas por papel alumínio, a fim de que ficassem protegidas da ação da luz ambiente, e oferecidas a todos os animais do experimento, no regime *ad libitum*, como única fonte de água disponível, durante um período de oito semanas de indução.

Após a fase de indução da carcinogênese, o carcinógeno não foi mais acrescentado na água de beber, permanecendo os animais em outro período de oito semanas na fase de promoção da carcinogênese. Durante esta fase seis animais morreram, sendo prontamente substituídos.

3.6 Organização dos grupos

Após a carcinogênese, todos os animais foram selecionados aleatoriamente e distribuídos em quatro grupos com cinco animais cada, de acordo com a apresentação na Tabela 1.

Tabela 01 - Distribuição dos grupos experimentais

Grupo	Intervenção	Nº animais
1	Controle positivo	5
2	LASER ($\lambda 808$ nm)	5
3	Imiquimode	5
4	Imiquimode + LASER ($\lambda 808$ nm)	5

3.7 Intervenções

3.7.1 Imiquimode

As aplicações do imiquimode em creme (Ixium 50 mg/g – FQM Farmoquímica S.A. RJ, Brasil) Fig. 1. foram realizadas nos animais dos grupos 3 e 4, três vezes por semana, em dias intercalados, sempre no período da manhã, durante um período de quatro semanas, perfazendo um total de 12 aplicações.

FIGURA 01 – Imiquimode

Para que a aplicação do creme pudesse ser realizada, cada animal foi manipulado individualmente, colocando-os sobre uma grade da gaiola e, tracionando-os cuidadosamente pela ponta da cauda a cabeça podia ser contida pelos dedos do operador e o animal era removido da grade. Com a cabeça imobilizada, distendida suavemente para trás e de frente para o operador, a boca do

animal podia ser mantida aberta com o auxílio de uma pinça de dissecação, pela mão oposta do operador, colocando-a entre os incisivos inferior e superior FIG.2.

FIGURA 02 – Manipulação do animal durante a intervenção



A aplicação do imiquimode foi realizada por um segundo operador, com o auxílio de uma espátula, uma camada uniforme foi depositada no dorso lingual. Em cada aplicação era colocado aproximadamente 25 mg do creme. Após as aplicações, os animais eram mantidos sem água ou ração por 30 minutos, para que o medicamento pudesse permanecer por mais tempo sobre a língua (MONTEIRO *et al* 2013).

3.7.2 LASER (λ 808 nm)

Os animais dos grupos 2 e 4 foram irradiados com o aparelho Photon Lase III (DMC equipamentos LTDA, São Carlos - SP) Fig. 3. O equipamento possui duas ponteiros independentes, as quais emitem feixe de luz em comprimentos de onda diferentes; sendo uma no espectro vermelho (λ entre 630 a 690 nm e meio ativo InGaAlP) e outra no espectro infravermelho (λ entre 790 a 830 nm e meio ativo AsGaAl). O diâmetro de cada ponteira é de com potência útil do emissor de 100 mW. Para este estudo foi escolhido o espectro infravermelho de λ 808 nm.

A densidade de energia foi de 10 J/cm², aplicada pontualmente na língua dos animais, por contato, durante um tempo de aplicação de 9 segundos. Fig 4.

FIGURA 03 – Aparelho LASER**FIGURA 04 – Configurações no display**

As irradiações foram realizadas três vezes por semana, em dias intercalados, durante quatro semanas, em um total de 12 aplicações. Para que as irradiações pudessem ser realizadas, os animais foram manipulados da mesma forma que para a aplicação do imiquimode, descrita anteriormente. Sendo que, no grupo 3, foi realizada apenas a aplicação do LASER. Já no grupo 4, os animais foram irradiados imediatamente após a aplicação do imiquimode, semelhante a metodologia utilizada por MONTEIRO *et al* (2013).

De acordo com a legislação vigente, o LASER foi aplicado em local isolado, observando-se os procedimentos de segurança.

Não foram verificadas intercorrências nos animais durante o período das intervenções, os quais permaneceram em condições apropriadas até o fim do experimento.

3.8 Preparo das amostras

Decorridos dois dias após a última intervenção, todos os animais foram eutanasiados através de overdose de anestésico Thiopentax, 2ml por animal (tiopental sódico – Laboratório Cristália, Itapira, SP, Brasil). Verificada a morte dos animais, foram realizadas incisões nas comissuras labiais dos camundongos,

bilateralmente, com lâminas de bisturi nº 15, montadas em cabo Bard Parker, com o intuito de facilitar o acesso a região posterior da língua. Com uma tesoura de Joseph, as línguas foram excisadas na base, e acondicionadas em frascos plásticos numerados, contendo solução de formol a 10%, com volume aproximado dez vezes superior ao das peças cirúrgicas.

As amostras fixadas foram encaminhadas para o laboratório de Patologia da UFPE. Os espécimes foram identificados e processados de acordo com a rotina para inclusão de parafina e submetidos à microtomia, sendo realizados cortes de 5 µm de espessura destinados à coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

3.9 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada por dois patologias calibrados e obedeceu o critério de avaliação tipo cega. Foi utilizado microscópio óptico Leica DM 750 (Wetzlar, Alemanha) com aumento 40X. Os critérios usados para classificação das alterações histológicas foram de acordo com a OMS e empregados em outros estudos (GALE *et al* , 2005; MONTEIRO *et al* 2012).

A classificação histológica foi escalonada com valores que variaram de 1 a 3 com a seguinte ordem:

- 1- atrofia epitelial;
- 2- displasia leve;
- 3- displasia moderada;
- 4- displasia severa;
- 5- carcinoma *in situ*;
- 6- carcinoma bem diferenciado;
- 7- carcinoma invasivo.

O Infiltrado inflamatório foi ordenado da seguinte maneira:

- 0 - Ausente;
- 1 - Leve;
- 2 – Moderado;
- 3 - Intenso.

3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram a testes estatísticos e expressos em percentuais. Foi aplicado o teste da razão de verossimilhança que é baseada na comparação das frequências observadas com as previstas pelo modelo.

O software utilizado foi o SPSS 20.0 e o Excel 2007. Foi adotado 5% de significância ($p < 0,05$).

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Carcinogênese

A carcinogênese resulta de uma agressão ao genoma da célula, com alterações do DNA (mutações) ou expressão anômala de genes anormais. Quando células da boca e região perioral sofrem esse dano, a ocorrência do câncer de boca pode ser observada, acometendo sítios como os lábios e a cavidade oral (mucosa jugal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca), sendo a maioria deles do tipo carcinoma epidermóide. É uma lesão agressiva, proliferativa e que provoca metástase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Fatores de natureza variada como os agentes físicos, químicos e biológicos são capazes de induzir agressão ao genoma e levar ao desenvolvimento neoplásico. Os agentes químicos foram reconhecidos como fatores etiológicos do câncer para o homem desde o século XVIII, mas somente no século XX que se desenvolveram modelos animais de carcinogênese química. Esses estudos trouxeram contribuições importantes para a identificação de novos agentes cancerígenos e para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer (MONTENEGRO, FRANCO, 1999).

Sendo a carcinogênese química um processo dinâmico, pode ser dividida didaticamente em etapas: iniciação, promoção e progressão (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.* 2005). No estágio de iniciação, ocorre o dano ao DNA causado pela exposição a uma substância química mutagênica (KUMAR *et al.*, 2008; SANTELA *et al.*, 2005). No estágio de promoção, a carcinogênese pode ser potencializada pela exposição a promotores, que estimulam a proliferação das células que sofreram mutação (KUMAR *et al.*, 2008). Ainda é uma fase reversível, pois a suspensão do contato pode interromper o processo, permitindo a regressão da proliferação celular provavelmente por apoptose (GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001). No estágio da progressão ocorre a multiplicação desordenada, com transformação maligna. A proliferação celular ocorre independente da presença do estímulo, e caracteriza-se pela instabilidade genética, crescimento rápido, metástases, e alterações metabólicas, bioquímicas e morfológicas nas células (Lutz 2000; GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001).

O 4NQO é um derivado da quinolina, que exerce um potente estresse oxidativo intracelular e seu produto metabólico se liga ao DNA, predominantemente

à guanina residual. Essa agressão parece similar aos danos impostos por outros carcinógenos presentes no tabaco, o qual é um grande fator de risco para o câncer oral. O modelo de indução química do desenvolvimento de carcinomas orais através do 4NQO é válido para o estudo dos mesmos (VERED *et al.*, 2007).

Alguns autores relatam a importância do processo inflamatório para a progressão das neoplasias malignas, sugerindo que a inflamação contribui para a proliferação de células malignas (MANTOVANI *et al* 2008).

4.2 Imiquimode

O imiquimode (1 - (2-metilpropil)-1-H-imidazol[4,5-c]quinolona-amina) é um composto sintético capaz de ativar as células do sistema imunológico, ajudando a controlar os vírus, tumores, e parasitas intracelulares. Ativa as células do sistema imune, células dendríticas, macrófagos e monócitos, liberando citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, ativando os linfócitos T e reforçando o sistema imune (STANLEY, 2002).

A terapia imunológica vem utilizando drogas imunomoduladoras, com o intuito de exarcebar ou reduzir a resposta imune (LIMA, 2004).

O imiquimode é comercializado sob a forma de um creme homogêneo, inodoro, branco ou ligeiramente amarelo a 5% (Ixium® 50mg/g com 12 sachês de 250 mg cada – FQM Farmoquímica Rio de Janeiro – RJ).

O uso tópico do imiquimode, em creme, é indicado para o tratamento do carcinoma basocelular superficial, verrugas genitais virais, condilomatose e queratose actínica (EDWARDS; OWENS; COUTURE, 2000). Possui ação imunomoduladora com atividade anti-câncer (JOBANPUTRA; RAJPAL; NAGPUR, 2006), possuindo duas propriedades reconhecidas: pró-apoptótica e imunomoduladora (MACEDO; CARNEIRO; MATAYOSHI, 2007). Tem sido utilizado com esse propósito, seu uso tópico tem sido associado a melhorias nos quadros clínicos de carcinomas basocelulares (CORREA; FERREIRA; GOLLNER *et al.*, 2009).

Algumas evidências apontam que a influência do imiquimode na apoptose celular vem da modulação de transdutores de sinais e ativadores de transcrição e sinalização, que contribuem para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias

(BOTTRELL; YANG; LEVY *et al.*, 1999) que podem estar envolvidas na apoptose celular (STEPHANOU; LATCHMAN, 2005).

A ação pró-apoptótica de imiquimode ocorre através da modulação da família Bcl-2, que regula a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (SCHON e SCHON, 2007; VIDAL; MATIAS-GUIU; ALOMAR, 2004; DE GIORGI, SALVINI, CHIARUGI *et al.*, 2009). O gene Bcl-2 é considerado a “chave reguladora da apoptose”, pois codifica uma proteína que inibe a apoptose. Sua expressão anormal pode levar a “imortalização” da célula, predispondo-a ao desenvolvimento de neoplasias (ISOHERRANE, 1999). Em adição, a aplicação do imiquimode *in vivo*, levou ao aumento da expressão de receptores de morte celular CD95 e à diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (BERMAN; SULLIVAN; DE ARAUJO; NADJI, 2003).

Demonstrou-se que as células tornam-se mais susceptíveis a apoptose, devido à redução da expressão de Bcl-2, que ocorre após ao tratamento com imiquimode creme a 5% (SCHON e SCHON, 2007; VIDAL; MATIAS-GUIU; ALOMAR, 2004; DE GIORGI, SALVINI, CHIARUGI *et al.*, 2009).

O imiquimode apresenta também ação imunomoduladora, sendo capaz de ligar-se a receptores específicos nas células dendríticas. Dessa união, resulta a transcrição e liberação de citocinas pró-inflamatórias locais sendo suficiente para induzir uma resposta imune celular tumor-específica. A propriedade anti-tumoral do imiquimode está relacionada primariamente à ativação do sistema imune inato pelo qual as células dendríticas cutâneas parecem ser as células responsáveis. Estas células respondem a baixas concentrações do imiquimode do que outros tipos celulares (SCHÓN e SCHÓN, 2007; MACÊDO, CARNEIRO e MATAYOSHI, 2007).

Outro provável mecanismo de ação do imiquimode no sistema imune seria a capacidade de modular a função das células de Langerhans, estimulando a migração para linfonodos regionais onde elas provavelmente promoverão uma resposta específica das células T (FESTA NETO, 2002; SCHÓN e SCHÓN, 2007). A terapia com imiquimode promove a diminuição de células de Langerhans na epiderme enquanto aumenta o número no interior do tumor. (DEGIORGI *et al.*, 2009).

Em estudo realizado em CECs induzidos em mucosa jugal de ratos, os autores observaram uma diminuição de 60% dos tumores após quatro semanas de aplicação do imiquimode em dias alternados e ainda, um aumento do número de

células dendrídicas, sugerindo uma importante proteção imune contra a proliferação neoplásica (MONTEIRO *et al*, 2013).

O papel exato do imiquimode na apoptose tumoral ainda não está totalmente esclarecido, e existem poucos estudos que relatam aplicações do imiquimode em mucosa oral. A situação *in vivo* é certamente complexa e inclui vários níveis de interação entre vários tipos de células e mediadores que podem ser afetados direta ou indiretamente pelo imiquimode (SCHON e SCHON, 2007).

4.3 LASER

Os principais efeitos da luz LASER de baixa intensidade são fotoquímicos. A absorção da energia emitida pelo LASER nas células produz a estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas, permitindo a instalação de processos fisiológicos de natureza terapêutica, analgésicas e anti-inflamatórias (GENOVESE, 2007). O LASER de baixa intensidade tem ação principalmente nas membranas plasmáticas e organelas celulares, sobretudo 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 a energia emitida promovem reações químicas intracelulares (KARU, 1988).

O LASER de baixa potência pode ser classificado, de acordo com o seu comprimento de onda, em vermelho (visíveis) ou infravermelho (invisíveis). Os primeiros são absorvidos por cromóforos da membrana mitocondrial, provocando um efeito fotoquímico, diferentemente dos infravermelhos, que são absorvidos principalmente pela membrana celular, provocando efeitos fotofísicos e fotoelétricos (KARU, 1989).

Os fotorreceptores celulares que fazem parte da cadeia respiratória podem ser estimulados ou inibidos pelos fótons da luz LASER, determinando assim a magnitude da proliferação celular. Evidências demonstram que o laser atua tanto em células não neoplásicas como em células neoplásicas, e que a proliferação celular pode ser estimulada dependendo dos parâmetros de utilização do LASER. Uma dose fora dos padrões pode oferecer um resultado negativo, não estimulatório ou mesmo inibitório. (SCHINDL *et al.*, 2000; CARNEVALLI *et al.*, 2003)

A terapia a LASER é utilizada em muitos países, e seu uso na área médica e odontológica está aumentando rapidamente, devido a uma série de

indicações para seu uso dentre elas a diminuição da dor e inflamação, melhoria da reparação, podendo ser usado isoladamente ou como coadjuvante a outros tratamentos, sempre que se necessite de um efeito local, já que há estimulação da microcirculação e trofismo celular (CASTRO, 2005).

Em estudo para avaliação histológica da ação do LASER de baixa intensidade, $\lambda 660$ nm, em lesões cancerígenas, induzidas quimicamente em mucosa oral de hamsters, foi verificado um aumento significativo na progressão da severidade do carcinoma escamo celular (Monteiro *et al.*, 2011).

Dependendo do seu comprimento de onda, a luz LASER pode interagir de forma diferente com tecidos de natureza diferentes, sadios ou malignos (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conclusão deste trabalho resultou em um artigo orientado pela Prof^a Dr^a Jurema Freire Lisboa de Castro, o qual está disposto no apêndice.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V.; LEITÃO, 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. **Quím. Nova**, v.28, n.1, p.118-129, jan./fev. 2005.
- ALGHAMDI, K.M., KUMAR, A., MOUSSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med. Sci.** v. 27, p. 237–249, 2012.
- BERMAN, B.; SULLIVAN, T.P.; DE ARAUJO, T.; NADJI, T. Expression of Fasreceptor on basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle. **Br J Dermatol**, 2003; 149 (Supl.):59–61.
- BOTTRELL, R.L.; YANG, Y.L.; LEVY, D.E. *et al.* The immune response modifier imiquimod requires STAT-1 for induction of interferon, interferonstimulated genes, and interleukin-6. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, p. 856–61, 1999.
- BRUGNERA, JR.A. Biomodulatory effect of lasertherapy-Clinical indications in Detistry. **Brazilian Dental Journal**, v.15, p.60, 2004.
- 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.
- CASTRO, J. F. L. **Oncologia Oral**. 1. ed. Recife: Editora Universitária da UFPE, v. 01. 254 p., 2005.
- CASTRO, J.L.F.; PINHEIRO, A.L.B.; WERNECK, C.E.; SOARES, C.P. The effect of laser therapy on the proliferation of oral carcinoma cells: an in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**. V.23, p.586-589, 2005.
- CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa.Disponívelem:http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=HAMSTER&id_ani=8&pes_dade=sim. Acesso em: 17/10/2012.
- COLOMBO, F.; SOUSA, A.P.C.; MARCHIONNE, A.M.T.; PINHEIRO, A.L.B.P.; REIS, S.R.A. Effect of low-level laser therapy (λ 660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Brazilian Dental Journal**. v. 24, n.4, p. 308-312,2013.
- CORREA, M.P.D.; FERREIRA, A.P.; GOLLNER, A.M.; RODRIGUES, M.F.; GUERRA, M.C.S. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. **An Bras Dermatol**. v. 84, n.6, p. 606-14, 2009.
- DE GIORGI, V., SALVINI, C., CHIARUGI, A. *et al.* In vivo characterization of the inflammatory infiltrate and apoptotic status in imiquimodtreated basal cell carcinoma. **Int J Dermatol**. v, 48:312–321, 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. **Rev Bras Otorringol.** V.70.n.1,p.35-40 jan/fev.,2004.

EDITORIAL REVIEW. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncology**, v. 41, p. 337-339, 2005.

GALE, N.; PILCH, B.Z.; SIDRANSKY, D.; EI NAGGAR, A.; et al. Epithelial precursor lesions. In: WHO classification of tumours. Head and neck tumours. **IARC**, pp 177–179, 2005.

GENOVESE, W. J. **Laser de Baixa Intensidade - Aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Santos, 2007. 130 p.

GIMENEZ-CONTI, I.B.; SLAGA, T.J.S. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 53, n. 17, p. 83–90, 2004.

GUTIÉRREZ, J.B.; SALSAMENDI, A.L. Fundamentos de ciência toxicológica. **Díaz de Santos**, Madrid, p.155-177, 2001.

HWA JEE, S.; CHUAN SHEN, S.; REN TSENG, C.; CHING CHIU, H.; LIANG KUO, M. Curcumin Induces a p53-dependent apoptosis in Human Basal cell carcinoma cells. **J Invest Dermatol**. v. 111, p. 656-61, 1998.

ISOHERRANEN, K. UV irradiation induces down regulation of Bcl-2 expression in vitro and in vivo. **Arch Dermatol**. v. 291, p. 212-6, 1999.

JOBANPUTRA, K.S.; RAJPAL, A.V.; NAGPUR, N.G. (2006) Imiquimod. **Ind J Dermatol Venereol Leprol**. v, 72, p. 466–469, 2006.

KANOJIA, D., VAIDYA, M.M. 4 – Nitroquinoline – 1- oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncology**, v.42, p. 655-667, 2006.

KARU, T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. **J. Photocem. Photobiol**. v 3, p. 638, 1989.

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

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n.4, p: 353–358, 2003.

LIMA, H.C. Imunologia clínica de 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. **An Bras Dermatol**, v.82, n.3, p.207-21, 2007.

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

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A., BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature** v. 24 n.3 p:436-44, 2008.

MACEDO, E.M.S.; CARNEIRO, R.C.; MATAYOSHI, S. New approach to periocular basal cell carcinoma treatment: imiquimod. **Rev Br Oftalmol.** v. 66, p. 63–428, 2007.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2012 para incidência de neoplasia maligna da cavidade oral. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=9>.

MONTEIRO, J.S.C.; OLIVEIRA, S.C.P.S.; REIS JUNIOR, S.A.; GURGEL, C.A.S.; SOUZA, S.C.O.M.; PINHEIRO, A.L.B.; SANTOIA, J.N. Effects of imiquimode and low-intensity laser therapy (660nm) in chemically induced oral carcinomas in hamster buccal pouch mucosa. **Laser in Medical Science**, v.28, n.3, 2013.

MONTEIRO, J.S.C.; PINHEIRO, A.L.B.; De OLIVEIRA, S.C.P.S.; ACIOLE, G.T.S.; SOUSA, J.A.C.; CANGUSSU, M.C.T.; DOS SANTOS, J.N. Influence of Laser Phototherapy (λ 660 nm) on the Outcome of Oral Chemical Carcinogenesis on the Hamster Cheek Pouch Model: Histological Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.29, n.11, 2011.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. **Patologia Dos Processos Gerais.** 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 291p., 1999.

MURAYAMA, H.; SADAKANE, K.; YAMANOHA, B.; KOGURE, S. Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. **Lasers Med. Sci.** v, 27, p. 87–93, 2012.

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.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Saunders Elsevier, p 709–711, 2009.

NOVOSELOVA, E.G.; GLUSKOVA, O.V.; CHERENKOV, D.A.; CHUDNOVSKY, V.M.; FESENKO, E.E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** V.22, p.33-38, 2006.

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

PATEL, G.K.; GOODWIN, R.; CHAWLA, M. et al. Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen's disease): A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J AM ACAD DERMATOL**, v. 54, n. 6, p. 1025-1032, 2006.

PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, D.T.; LANDMAN, G; KOWALSKI, L.P. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. **JCDA**. V.73, n.4, p. 339-344, may., 2007.

PINHEIRO, A. L. B., NASCIMENTO, S.C., VIEIRA, A.L.B., BRUGNERA, JR.A., ZANIN, F.A., ROLIM, A.B., SILVA, P.S. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *In vitro* study. **Journal of clinical laser Medicine & Surgery**, v.20, n.1, p. 23-26, 2002.

PINHEIRO, A L. B.; BRUGNERA JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. (Org.). **Aplicação do Laser na Odontologia**. 1 ed. Santos: Livraria Santos Editora, v. 1, p. 1-22, 2010.
PIRES-OLIVEIRA, D.A.A.; OLIVEIRA, R.F.; MACHADO, A.H.A.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Laser Biomodulation on L 929 Cell Culture. **Photomed. Laser Surg**. v. 28, p. 167-171, 2010.

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. **Mutat Res** v.592, p.29-35, 2005.

SCHINDL, A. *et al.* Low intensity laser therapy; a review. **J. Inv. Med.**, v.48, n.5, p.312-326, 2000.

SCHON, M.P.; SCHON, M. Imiquimod: mode of action. **Br J Dermatol**. v, 157p.8-13, 2007.

SOUSA, A.P.C.; PARAGUASSÚ, P.M.; SILVEIRA, N.T.T.; SANTOS, J.N.; PINHEIRO, A.L.B. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. **Lasers Med. Sci.** 2012

STANLEY, M.A. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. **Clin Exp Dermatol**. v. 27, p. 571-577, 2002.

STEPHANOU, A.; LATCHMAN, D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. **Growth Factors**, v. 23, p. 177-82, 2005.

STRATIGOS, A.J. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. v. 19, p. 180-6, 2005.

SUZUKI, R., KOHNO, H., SUZUI, M., YOSHIMI, N., TSUDA, H., WAKABAYASHI, K., TANAKA, T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. **Carcinogenesis**, v.27, n.3, p. 619-630, 2006.

VERED, M., ALLON, I., BUCHNER, A., DAYAN, D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. **Oral Oncology**, v.43, p.999-1006, 2007.

VIDAL, D.; MATIAS-GUIU, X.; ALOMAR, A. (2004) Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki-67, p53, and basal cell carcinoma apoptosis. **Br J Dermatol.** v. 151, p. 656–662, 2004.

WERNECK, C.E.; PINHEIRO, A.L.B.; PACHECO, T.T.P.; SOARES, C.P.S.; CASTRO, J.F.L. Laser Light Is Capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Culture: A Spectroscopic *in Vitro* Study. **Photomed. Laser Surg.** v. 23, p. 300-303, 2005.

WHITFIELD, M.L., GEORGE, L.K., GRANT, G.D., PEROU, C.M. Common markers of proliferation. **Nature reviews cancer**, v.6, p.99-106, February, 2006.

APÊNDICE - A R T I G O**EFEITOS DO LASER λ (808nm) EM BAIXA INTENSIDADE E DO IMIQUIMODE EM CARCINOMAS ORAIS QUIMICAMENTE INDUZIDOS EM CAMUNDONGOS: ESTUDO HISTOLÓGICO**

EFFECTS OF LOW-INTENSITY LASER λ (808) AND IMIQUIMOD IN CHEMICALLY INDUCED ORAL CARCINOMAS IN MICE: HISTOLOGICAL STUDY

Paulo Henrique Azevedo de Holanda Cavalcanti ¹

Jurema Freire Lisboa de Castro ²

¹ Ms Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

e-mail: phcavalcanti@ig.com.br

² PhD, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

e-mail: jurema.lisboa@ufpe.br

RESUMO

O imiquimode é uma droga imunomoduladora que tem sido empregada no tratamento de neoplasias cutâneas. Sua ação na mucosa em carcinoma oral não está bem definida. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do imiquimode, associado ou não ao LASER de baixa intensidade $\lambda(808\text{nm})$, em carcinomas orais induzidos quimicamente em camundongos. Vinte animais foram induzidos a carcinogênese através do N-óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) na água de beber. Após 16 semanas, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, com cinco camundongos cada. Os animais do grupo 1 (controle positivo) não receberam intervenção. No grupo 2 (LASER) os animais foram irradiados com LASER de baixa intensidade ($\lambda 808\text{nm}$), 12 aplicações em dias alternados. No grupo 3 (imiquimode) os animais receberam 12 aplicações de imiquimode creme em dias alternados. Já os animais do grupo 4 receberam as 12 aplicações do imiquimode seguidas da irradiação com o LASER. Ao final do tratamento os animais foram submetidos a eutanásia e as amostras encaminhadas para estudo histológico através de microscopia. Os resultados demonstraram a presença de tumores malignos em todos os grupos, tendo o G3 os maiores índices 100% e o G1, G2 e G4 60%. Além disso, segundo o grau histológico, o G2 apresentou diferença estatisticamente significativa superior ao G1 ($p=0,022$). Neste trabalho, o tratamento com imiquimode potencializou o desenvolvimento dos carcinomas e o LASER estimulou a proliferação de células malignas. A associação do imiquimode com o LASER necessita de maiores investigações futuras.

Palavras-Chave: Laserterapia, Carcinogênese, Imiquimode, Carcinoma.

ABSTRACT

Imiquimod is a drug used in cutaneous neoplasms treatment. Its mechanism of action in mucosa in oral carcinoma is not well defined. The aims of this study were to evaluate the potential of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to induce cancer, as well as, to investigate the effects of imiquimod and laser treatments applied to such lesions. 20 mice were randomly divided into four groups (n=5) and cancerous lesions induced with a 4NQO in drink water solution. In Group 1 mice (control) lesions were not subjected to any form of treatment. In Group 2, they were treated with 12 applications of imiquimod cream, administered locally on alternate days. In Group 3, the laser group, lesions were irradiated with a low density laser beam ($\lambda 808\text{nm}$) following the same protocol used for group 2. In Group 4 mice, lesions were initially treated with imiquimod (12 applications) followed by laser irradiation. 2 days post-treatment, the mice were euthanized, dissected and tissue samples subjected to histological analysis by optical microscopy. The presence of malignant lesions was observed in all groups with a higher prevalence in Group 3 (100%) followed by Groups 1, 3 and 4 (60%). The 4NQO was effective in induce experimental oral carcinogenesis. Furthermore, when compared to those of Group 1, Group 3 lesions were also of a higher histological grade ($p=0.022$). These results suggest both that imiquimod does not reduce the occurrence of SCCs and that laser treatment may influence malignant cell proliferation. Additional studies are needed for further clarification of the effects of combined imiquimod /laser treatment.

Key-words: Lasertherapy, Carcinogenesis, Imiquimod, Carcinoma.

INTRODUÇÃO

O modelo de indução química de carcinomas em línguas de camundongos através da utilização do N-óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) tem se mostrado efetivo para o estudo da carcinogênese [1,2]. O 4NQO exerce uma ação oxidativa no núcleo celular, levando a alterações no seu DNA, semelhante aos danos que são provocados pelo tabaco, um comprovado fator de risco para o câncer oral [3].

Os estágios seqüenciais da carcinogênese, hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma de células escamosas são induzidos pelo 4NQO. Além disso, são produzidas alterações moleculares e histológicas como visto na carcinogênese oral humana [1,4].

Atualmente a imunoterapia vem empregando drogas imunomoduladoras que agem estimulando ou suprimindo a resposta imune [5]. O imiquimode (1 - (2-metilpropil)-1-H-imidazol[4,5-c]quinolona-amina) é um composto sintético capaz de ativar as células do sistema imunológico, ajudando a controlar os vírus, tumores, e parasitas intracelulares [6]. Possui ação imunomoduladora com atividade anti-câncer [7,8], além das reconhecidas propriedades pró-apoptóticas [9,10].

Algumas evidências apontam que a influência do imiquimode na apoptose celular vem da modulação de transdutores de sinais e ativadores de transcrição e sinalização, que contribuem para a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que podem estar envolvidas na apoptose celular [11]. Em adição, a aplicação do imiquimode *in vivo*, levou ao aumento da expressão de receptores de morte celular e à diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas [12].

Foi demonstrado que o laser de baixa intensidade estimula a atividade de células efetivas na resposta imune *in vitro*. Entretanto a influência desse estímulo em modelo animal ainda não está bem definido [13]. Os fotorreceptores celulares que fazem parte da cadeia respiratória podem ser estimulados ou inibidos pelos fótons da luz laser, determinando assim a magnitude da proliferação celular. Evidências demonstram que o laser atua tanto em células não neoplásicas como em células neoplásicas, e que a proliferação celular pode ser estimulada dependendo dos parâmetros de utilização do laser. A dose de radiação e a densidade de energia são os parâmetros mais importantes na fotobioestimulação. Uma dose fora dos padrões pode oferecer um resultado negativo, não estimulatório ou mesmo inibitório [14,15].

Os efeitos do LASER em células malignas porém, ainda são controversos, visto que a luz LASER ora tem estimulado, ora inibido ou mesmo é indiferente na proliferação de células malignas [16-19].

Efeitos fotobiomodulatórios do LASER de baixa intensidade já foram determinados em diversos clones celulares, malignos ou não, porém, a maioria desses estudos se deu em cultura de células [20–21], o que não reflete a realidade da complexa biologia do câncer [22]. O imiquimode possui reconhecida ação apoptótica [23], porém, ainda são escassos os estudos que dissertem sobre sua utilização no câncer de cavidade oral [24]. Assim sendo, tanto o LASER de baixa intensidade, como o imiquimode, podem ser investigados como moduladores da resposta imune em carcinomas orais *in vivo*, em modelo animal. Desta forma, este estudo visa avaliar os efeitos do LASER de baixa intensidade e do imiquimode em carcinomas orais quimicamente induzidos pelo 4NQO em língua de camundongos, através de estudo histológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. processo nº 23076.051247/2012-58, obtendo parecer favorável (Anexo A). Foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), especialmente a Lei 11.794, e The National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

Foram obtidos 20 camundongos albinos, machos Swiss isogênicos proveniente do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno grande com 45 x 30 x 12 cm de dimensão. Receberam água e ração sólida peletizada¹ com alto teor de proteína (20 a 27%) *ad libitum*. Os animais ficaram sempre sob temperatura controlada $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas.

Todos os animais foram induzidos a desenvolver carcinomas orais através da administração do 4NQO na água de beber como descrito em trabalhos anteriores [1,2].

¹ Labina® Purina Nutrimentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Decorridas 16 semanas, oito da fase de indução e oito da fase de promoção da carcinogênese, os animais foram divididos em quatro grupos de cinco, e submetidos às intervenções da seguinte forma: grupo 1 – controle positivo; grupo 2 – aplicação de imiquimode² creme 3 vezes por semana, em dias alternados, no total de 12 sessões; grupo 3 – aplicação do LASER⁴ de baixa intensidade $\lambda(808\text{ nm})$ 3 vezes por semana, em dias alternados, no total de 12 sessões; grupo 4 – aplicação do creme imiquimode seguida da aplicação do LASER de baixa intensidade $\lambda(808\text{ nm})$ 3 vezes por semana, em dias alternados, no total de 12 sessões [24].

Foi utilizado o aparelho LASER³ de AsGaAl, em modo contínuo, aplicação por contato, durante 9 segundos, potencia de 30mW e densidade de energia de 3,9 J/cm². Os parâmetros utilizados nas irradiações com LASER podem ser visualizados na Tabela 1.

TABELA 2: Parâmetros e configurações do aparelho LASER

Parâmetros	Configurações
Comprimento de onda	808 nm
Medida da área do feixe	0,028 cm ²
Potencia média	30 mW
Irradiância	428,6 mW/cm ²
Modo	Contínuo
Fluência	3,9 J/cm ²
Energia	10 J
Tempo de exposição	9 s
Área	0,028 cm ²

Dois dias após a última sessão de intervenção, os animais foram submetidos a eutanásia com sobredose de anestésico local⁴ (2 ml). As línguas dos animais foram excisadas, fixadas e encaminhadas para o laboratório de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram processadas rotineiramente e coradas em hematoxilina/ eosina. A avaliação histológica foi realizada por dois patologias

² Ixium[®] 50 mg/g – FQM Farmoquímica S.A., Rio de Janeiro,RJ, Brasil

³ Photon Lase[®] III DMC, São Carlos, SP, Brasil

⁴ Tiopental sódico, Thiopentax[®] Cristália , Itapira, SP, Brasil

calibrados, e obedeceu o critério de avaliação tipo cega. Foi utilizado microscópio óptico⁵ com aumento de 40X.

O critério utilizado neste estudo para evidênciação e classificação das lesões foi o utilizado pela Organização Mundial de Saúde [24,25] (OMS). Assim sendo, além da atrofia epitelial, a displasia epitelial foi graduada em leve, moderada e severa. Os carcinomas escamocelulares foram graduados em *in situ*, diferenciado e invasivo. Para efeito da análise estatística, a classificação histológica foi escalonada com valores que variaram de 1 a 3 com a seguinte ordem:

- 1 - atrofia epitelial;
- 2 - displasia leve e moderada;
- 3 - displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma bem diferenciado.

O infiltrado inflamatório também foi analisado e, para efeito da análise estatística, ordenado da seguinte maneira:

- 0 - Ausente;
- 1 - Leve;
- 2 - Moderado;
- 3 - Intenso.

RESULTADOS

Antes do início do experimento, todos os animais estavam aparentemente saudáveis. Após a aplicação do carcinógeno e durante a realização dos tratamentos já era possível a verificação das alterações nas mucosas das línguas dos animais. Lesões exofíticas papilomatosas e áreas de ulcerações estavam presentes em muitos animais.

Os resultados obtidos da avaliação histológica desta pesquisa estão descritos na tabela abaixo:

⁵ Leica DM 750 Wetzlar, Alemanha

TABELA 3 Resultados da graduação histológica e do infiltrado inflamatório por grupo e em cada animal

GRUPO	Animal	Graduação histológica	Infiltrado inflamatório
Controle positivo	1	Displasia severa	Moderado
	2	Displasia moderada	Leve
	3	Atrofia epitelial	Ausente
	4	Displasia severa	Ausente
	5	Carcinoma bem diferenciado	Moderado
LASER	1	Displasia moderada	Moderado
	2	Displasia severa	Moderado
	3	Carcinoma in situ	Leve
	4	Carcinoma invasivo	Moderado
	5	Displasia leve	Leve
Imiquimode	1	Displasia severa	Leve
	2	Carcinoma bem diferenciado	Leve
	3	Carcinoma invasivo	Leve
	4	Carcinoma invasivo	Ausente
	5	Carcinoma invasivo	Leve
Imiquimode/LASER	1	Displasia moderada	Ausente
	2	Displasia severa	Ausente
	3	Carcinoma bem diferenciado	Intenso
	4	Carcinoma invasivo	Moderado
	5	Displasia moderada	Ausente

De acordo com a tabela abaixo, 60% dos animais dos grupos 1, 2 e 4 apresentaram displasia severa/carcinoma in situ/carcinoma e o grupo 3, 100% apresentaram o grau mais elevado, apenas no Grupo 1 apresentou atrofia (20%), mas essas diferenças não foram estatisticamente significante $p=0,230$. No geral 70% dos animais independente dos grupos apresentaram Displasia Severa/In situ/Carcinoma.

Tabela 4 Distribuição percentual por grupos

			GRUPOS				Total (n=20)	p- valor ¹
			G1(n=5)	G2 (n=5)	G3(n=5)	G4(n=5)		
GRAU(escores)								
1) Atrofia	Leve e Moderada		20%	0%	0%	0%	5%	0,230
2) Displasia			20%	40%	0%	40%	25%	
3) Displasia severa/carcinoma in situ/Carcinoma			60%	60%	100%	60%	70%	

G1-Grupo Controle;G2-Laser;G3-Imiquimode;G4-Imiquimode+Laser;1-valor de p da estatística da razão de Verossimilhança.

Em relação aos tipos de lesões em todos os animais (n=20), 30% apresentou Carcinoma invasivo, 25% Displasia severa, 20% Displasia moderada, 10% Carcinoma bem diferenciado e Carcinoma in situ, Displasia leve e Atrofia epitelial esses com 5% cada, conforme tabela a seguir.

Tabela 5 Prevalência das lesões

Lesões	Prevalência (n=20)
Atrofia epitelial	5%
Displasia leve	5%
Displasia moderada	20%
Displasia severa	25%
Carcinoma in situ	5%
Carcinoma bem diferenciado	10%
Carcinoma invasivo	30%

Segundo os percentis apresentados na tabela abaixo, a concentração dos escores mais elevados foram igualmente entre os grupos Laser e Imiquimode e Laser onde 50 dos resultados estavam entre os escores 2 e 3 (Displasia leve/moderada e Displasia Severa/In situ/Carcinoma). O grupo de imiquimode apresentou 100% dos animais com escore 3(Displasia Severa/In situ/Carcinoma).

Tabela 6 Percentis do grau(1 a 3) segundo o grupo

Grupo	Percentis			
	10	25	50(Media na)	75
Controle positivo	1	1,5	3	3
Laser	2	2	3	3
Imiquimode e LASER	2	2	3	3

O grupo imiquimode é constante

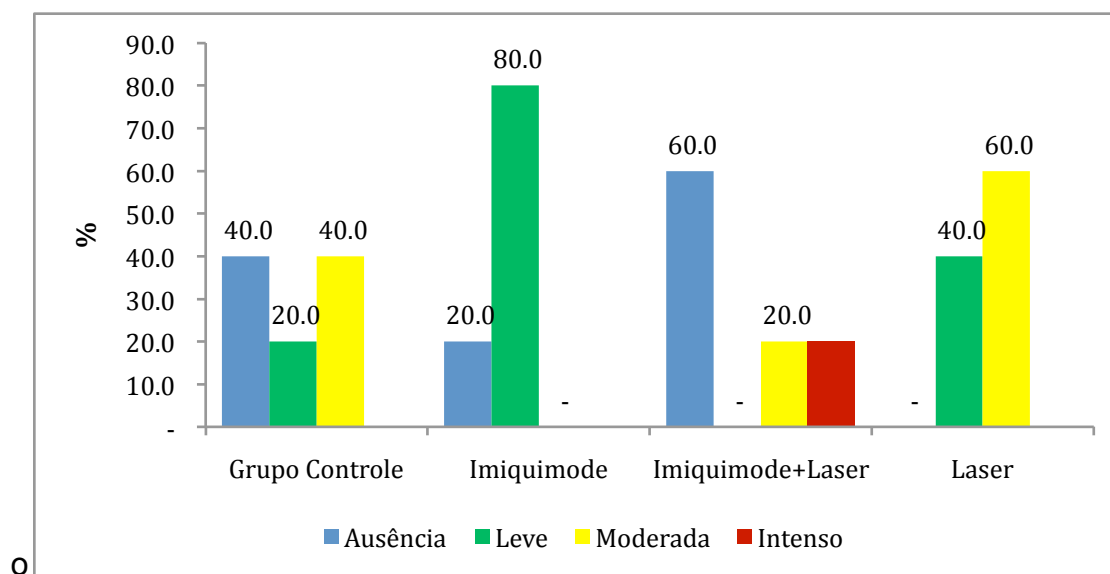
O grupo 3 difere estatisticamente dos outros grupos $p=0,038$, onde 80% do infiltrado inflamatório foi leve e 20% ausente.

Tabela 7 Percentual dos animais por grupo segundo o grau do infiltrado inflamatório

Grau	GRUPOS				p-valor ¹
	G1(n=5)	G2(n=5)	G3(n=5)	G4(n=5)	
Ausente	40%	-	20%	60%	0,038
Leve	20%	40%	80%	-	
Moderada	40%	60%	-	20%	
Intenso	-	-	-	20%	

G1-Grupo Controle;G2-Laser;G3-Imiquimode;G4-Imiquimode+Laser;1-valor de p da estatística da razão de Verossimilhança

Gráfico 1 Percentual dos animais por grupo segundo o grau do infiltrado inflamatório



Diferentes graduações histológicas podem ser visualizadas abaixo:

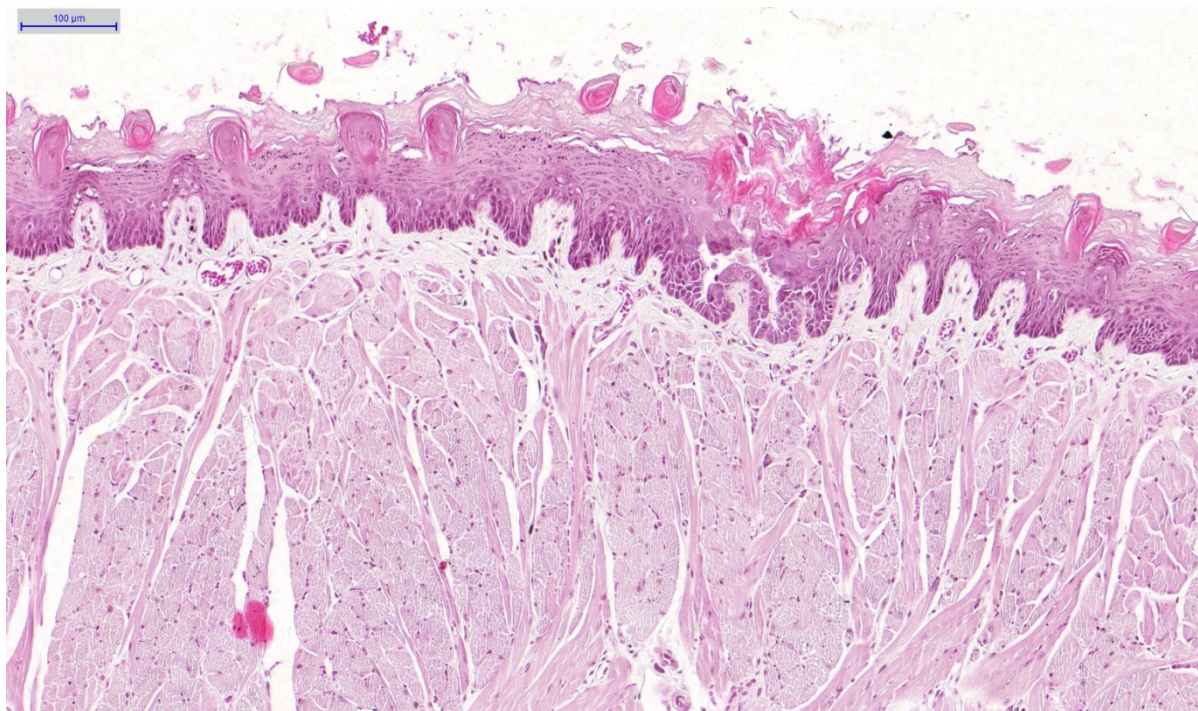


FIG. 5: fotomicrografia do Grupo 3 – displasia leve

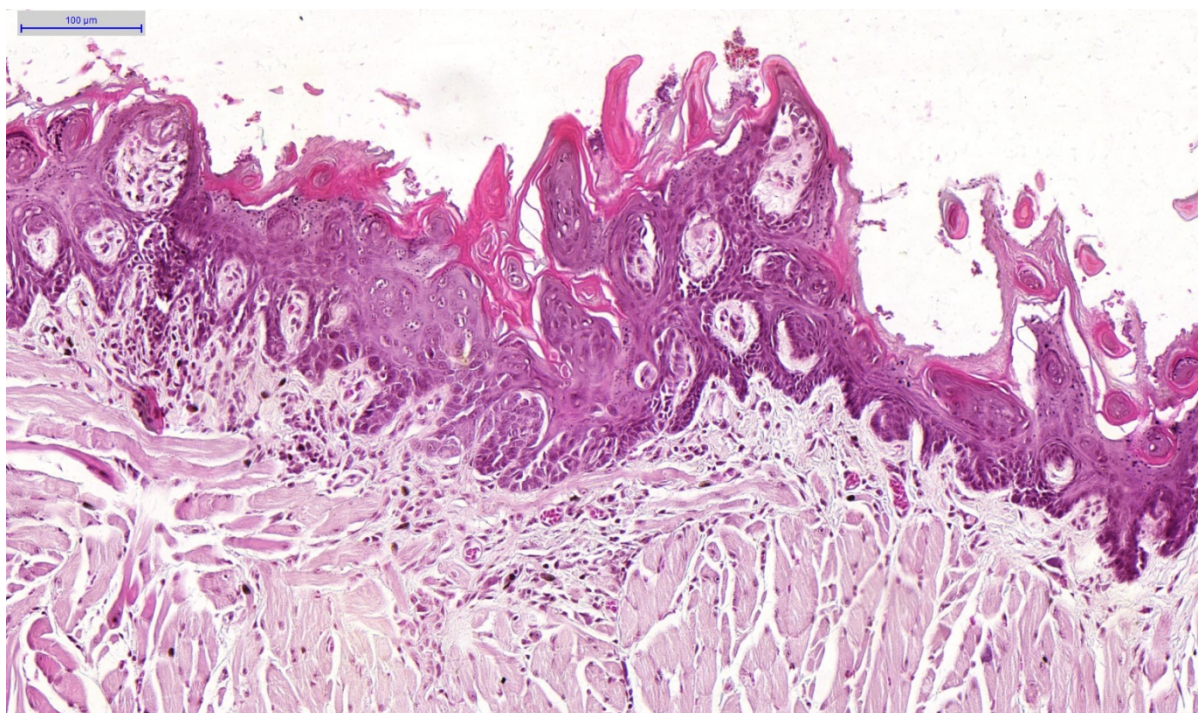


FIG. 6: fotomicrografia – displasia severa do grupo imiquimode

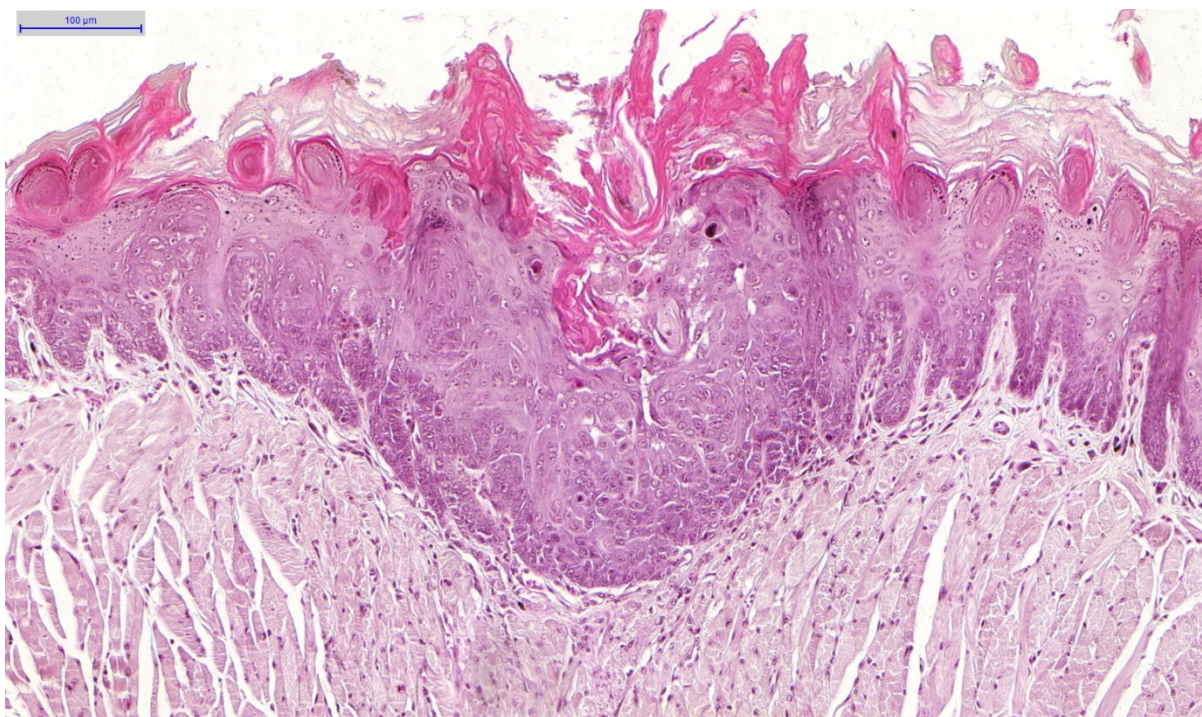


FIG. 7: fotomicrografia – carcinoma in situ do grupo imiquimode

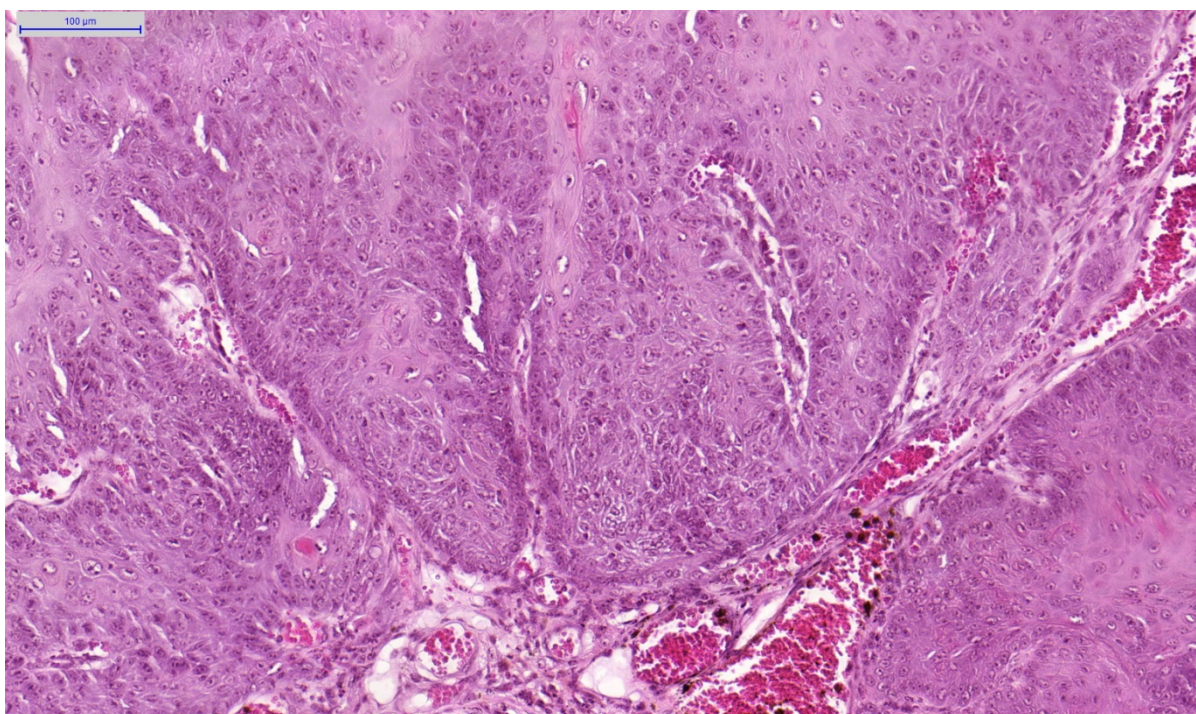


FIG. 8: fotomicrografia – CCE do grupo imiquimode

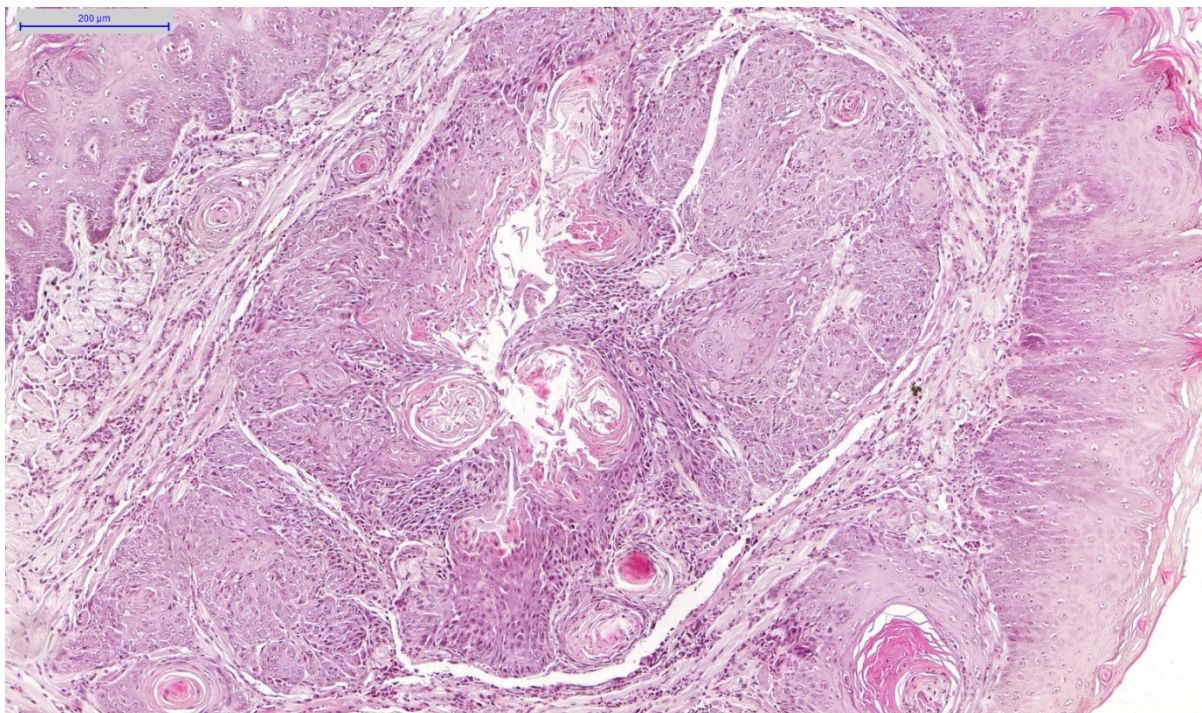


FIG. 9: fotomicrografia – carcinoma bem diferenciado do grupo controle positivo

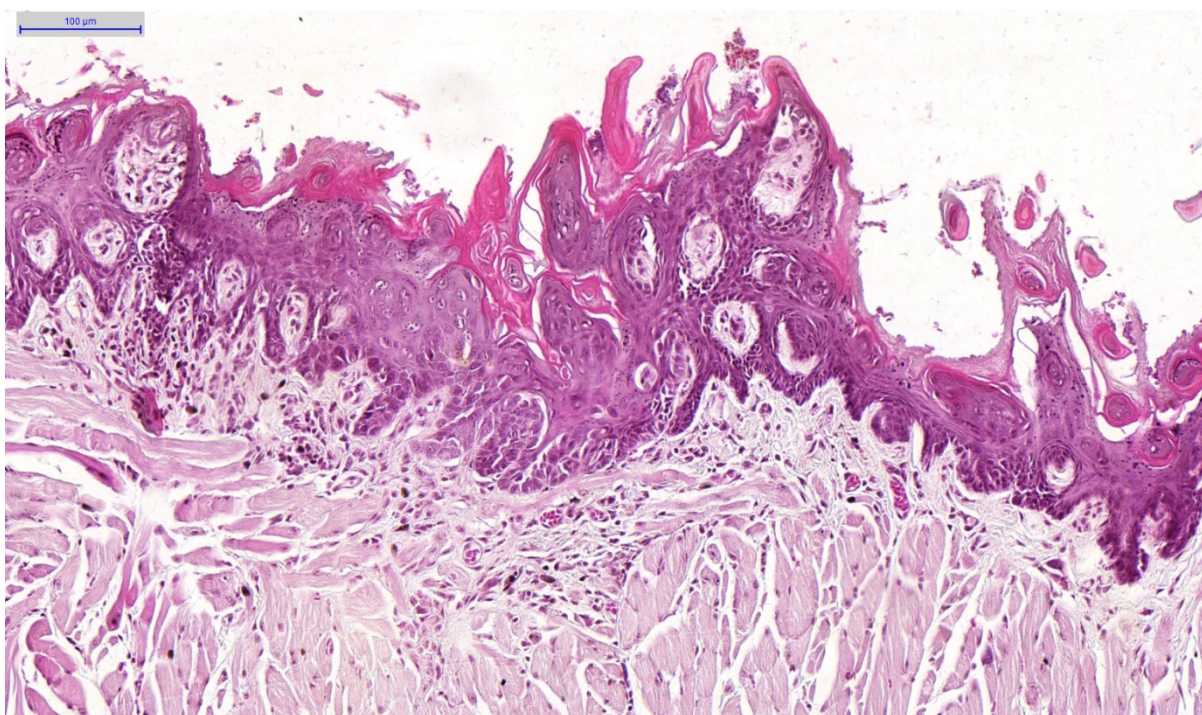


Fig.10: fotomicrografia: infiltrado inflamatório leve do grupo imiquimode e LASER

DISCUSSÃO

Todos os animais dos quatro grupos estudados apresentaram alterações malignas ou potencialmente malignas na mucosa lingual, o que corrobora com os resultados anteriores de diversas pesquisas [1-4]. Assim, concordamos que o carcinógeno 4NQO administrado na água de beber dos camundongos é um indutor da carcinogênese eficaz para utilização em pesquisa em modelo animal [2,4].

Os resultados encontrados demonstraram que o grupo Imiquimode apresentou grau histológico mais grave quando comparado com o grupo Controle, havendo uma diferença estatística entre eles ($p=0,02$), diferentemente de resultados encontrados por outros autores[23].

Devido a sua ação imunomoduladora e pró-apoptótica [7,8,10], o imiquimode é reconhecido como um medicamento anti-câncer [11] sendo seu uso tópico associado a melhorias nos quadros clínicos de carcinomas basocelulares [12]. Células malignas apresentam alterações em seus genes que, por sua vez, impactam em seu ciclo celular, propiciando o surgimento de clones de células que se multiplicam desordenadamente. Diferentes comportamentos podem ser observados quando células malignas de origens distintas interagem com determinadas medicações. Os carcinomas basocelulares apresentam um desenvolvimento diferente dos carcinomas escamo celulares orais [12], Estes apresentam um potencial de provocar metástases regionais e a distância [28], enquanto que esta natureza não é muito comum aos primeiros. Visto isso, não seria incomum que tumores de comportamentos diferentes reagissem, também, de forma diversa a mesma medicação.

O imiquimode é uma droga utilizada no tratamento do carcinoma basocelular superficial, verrugas genitais virais, condilomatose e queratose actínica [6,7,9], sendo seu uso tópico indicado através de evidências fornecidas na literatura, porém sobre seu uso em lesões neoplásicas malignas ou malignizáveis da cavidade oral, não são encontrados estudos suficientes que abordem essa questão.

Segundo outro estudo [26], a associação tumor/inflamação é muito observada e desempenha um papel importante na progressão das neoplasias. Na fase inicial do câncer a inflamação contribui para o desenvolvimento da doença e a sobrevivência

das células malignas. No entanto isto ativaria as células dendríticas no reconhecimento da lesão. Em fase posterior o sistema imune agiria para conter a proliferação tumoral. No grupo Imiquimode, o infiltrado inflamatório estava ausente ou foi classificado como leve, com diferença estatística entre os outros grupos, situação raramente encontra em neoplasias malignas invasivas, onde a abundância de células inflamatórias faz parte do microambiente tumoral [25]. Diante disto, podemos sugerir que nesta pesquisa, o imiquimode na mucosa oral, tenha suprimido a resposta inflamatória favorecendo a progressão tumoral. Maiores investigações são necessárias devido a quase inexistência na literatura da utilização do imiquimode na cavidade oral [23].

Diversos estudos dissertaram sobre o uso do laser de baixa intensidade em células malignas; diferentes resultados foram observados, dependendo da origem dos tumores irradiados, e de características do laser utilizado, como comprimento de onda, dose e tempo de aplicação [13,15]. No presente trabalho, o grupo que foi irradiado com laser de $\lambda 808$ nm, apresentou uma graduação histológica maior quando comparado ao grupo Controle, sugerindo que o laser exerceu um efeito bioestimulatório nas células irradiadas estimulando a proliferação, situação também observada por outros autores [18,19,23,]. Entretanto outros autores observaram resultados distintos deste trabalho, demonstrando que o Laser não exerceu ação na proliferação celular[14,15,21].

Dessa forma, diante de resultados antagônicos, os efeitos na proliferação celular provocados pelo LASER de baixa intensidade ainda são controversos, visto que resultados conflitantes foram observados quando houve a interação do mesmo com células tanto sadias quanto malignas.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados nesta pesquisa, podemos concluir que o imiquimode potencializou o desenvolvimento dos carcinomas induzidos pelo 4NQO nas línguas dos camundongos.

A utilização do LASER de baixa intensidade favoreceu a proliferação de células malignas.

A associação do imiquimode com o LASER necessita de maiores investigações futuras.

REFERÊNCIAS

1. Kanojia D, Vaydia MM (2006) 4 – Nitroquinoline – 1- oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology* 42: 655-667
2. DOI (2005) 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncology* 41: 337-339
3. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D (2007) Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncology* 43:999-1006
4. Suzuki R, Kohno H, Suzui M, Yoshimi N, Tsuda H, Wakabayashi K, Tanaka T (2006) An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4- nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis* 27:619-630
5. Lima HC *Imunologia clínica de imunomoduladores* (2004) In: Lima HC, *Tópicos em Imunodermatologia Clínica*. São Paulo: Segmento Farma 121-32
6. Stanley MA (2002) Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol* 27:571–577
7. Macedo EMS, Carneiro, R.C.; Matayoshi S. 2007 New approach to periocular basal cell carcinoma treatment: imiquimod. *Rev Br Oftalmol* 66:63–428
8. Schon MP, Schon M (2007) Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* 157:8–13
9. De Giorgi V, Salvini C, Chiarugi A et al (2009) In vivo characterization of the inflammatory infiltrate and apoptotic status in imiquimod-treated basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 48:312–321
10. Vidal D, Matias-Guiu X, Alomar A (2004) Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki-67, p53, and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* 151:656–662
11. Jobanputra KS, Rajpal AV, Nagpur NG (2006) Imiquimod. *Ind J Dermatol Venereol Leprol* 72:466–469
12. Correa MPD, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MCS (2009) Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 84: 606-14
13. Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Chudnovsky VM, Fesenko EE (2006) Effects of low-power laser radiation on mice immunity 22: 33-38
14. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L (2000) Low intensity laser therapy: a review. *Am J Ind Med* 48:312–316

15. Pinheiro ALB, Nascimento SC, Vieira ALB, Rolim AB, Silva OS, Brugnera JA (2002) Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. *Br Dental J* 13:109–112
16. Algamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2012) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med. Sci.* 27: 237–249
17. Pinheiro ALB, Nascimento SC, Vieira ALB, Brugnera JRA, Zanin FA, Rolim AB, Silva PS (2002) Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *In vitro* study. *Journal of clinical laser Medicine & Surgery* 20: 23-26
18. 24. Pinheiro ALB, Nascimento SC, Vieira ALB, Rolim AB, Silva OS, Brugnera JA (2002) Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. *Br Dental J* 13:109–112
19. Castro JFL, Pinheiro ALB, Werneck CE, Soares CP (2005) The effect of laser therapy on the proliferation of oral kb carcinoma cells: an in vitro study. *Photomedicine and Laser Surgery* V.23 586-589
20. Pires-Oliveira DAA, Oliveira R.F, Machado A, Zângaro RA, Pacheco-Soars C (2010) Laser Biomodulationon L 929 Cell Culture. *Photomed. Laser Surg.* 28: 167-171
21. Murayama H, Sadakane K, Yamanoha B, Kogure S (2012) Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. *Lasers Med. Sci.* 27: 87–93
22. Monteiro JSC, Pinheiro ALB, Oliveira SCPS et al (2011) Influence of laser phototherapy (660 nm) on the outcome of oral chemical carcinogenesis on the hamster cheek pouch model: histological study. *Photomed Laser Surg* 29:741–745
23. Monteiro JSC, Oliveira SCPS, Reis Junior SA, Gurgel CAS, Souza SCOM, PINHEIRO ALB, Santos JN (2013) Effects of imiquimode and low-intensity laser therapy (660nm) in chemically induced oral carcinomas in hamster buccal pouch mucosa. *Laser in Medical Science* 28
25. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A et al (2005) Epithelial precursor lesions. In: WHO classification of tumours. Head and neck tumours. IARC, Lyon, pp 177–179
26. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 24: 436-44
27. Pos Z, Sabatino M, Spivey T, Liu H, Falus A, Marincola FM (2009) Tumor-associated inflammation and impact on dendritic cell function. In: Shurin WE, Salter ED (eds) *Dendritic cells in cancer*. Springer, New York, p 295

28. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2014 para incidencia de neoplasia maligna da cavidade oral. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/mapa.asp?ID=9>

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 25 de fevereiro de 2013.

Ofício nº 548/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Jurema Freire Lisboa de Castro**
Departamento de Odontologia – UFPE
Processo nº23076.051247/2012-58

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeitos do imiquimode e do laser de baixa intensidade em carcinomas orais quimicamente induzidos em camundongos”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: biotério; Animais: camundongos Swiss isogênicos; nº total de animais: 35.

Atenciosamente,



Profª. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo B: Normas do periódico Lasers in Medical Science

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures
 Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures
 Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures -
 Case Reports will not be accepted!
 Letter to the Editor – up to 600 words

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)
 A concise and informative title
 The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
 The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any

undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.

Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].

Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be

accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork –

photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the

highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the

quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.
Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance to ethical requirements

Springer's statements on human and animal rights, conflict of interest and informed consent can be found at:

- Statement on Human and Animal Rights
- Conflict of Interest
- Informed Consent

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open

Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

SPRINGER OPEN CHOICE

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License..

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer

publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.