



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Efeito da luz pulsátil na pele normal e no modelo de dois estádios de cancro da pele em murganhos fêmea ICR

Dissertação de Mestrado apresentada por:

Davide Manuel Fernandes Rodrigues

Vila Real, 2013



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Efeito da luz pulsátil na pele normal e no modelo de dois estadios de cancro da pele em murganhos fêmea ICR

Dissertação de Mestrado apresentada por:

Davide Manuel Fernandes Rodrigues

Sob Orientação

Professora Doutora Adelina Gama Quaresma e Professora Doutora Paula Oliveira

Vila Real, 2013

Orientado por:

Professora Doutora Adelina Gama Quaresma
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Professora Doutora Paula Oliveira
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Este trabalho foi elaborado como dissertação original de candidatura ao grau de Mestre em Biotecnologia Para as Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Todo este caminho foi possível graças às pessoas que me acompanharam e apoiaram. Assim sendo, os meus sinceros agradecimentos:

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, uma universidade que me acolheu na Licenciatura e Mestrado, onde pude crescer profissionalmente e psicologicamente, permitindo-me tornar na pessoa que sou hoje.

À *Professora Doutora Adelina Gama*, orientadora da presente dissertação. Pela sua paciência, amizade e carinho. Pela leitura crítica e interpretação dos resultados da presente dissertação.

À *Professora Doutora Paula Oliveira*, co-orientadora deste trabalho. Pela sua simpatia e carinho ao longo deste ano. Pela leitura crítica da presente dissertação e pelos conhecimentos transmitidos.

À *Professora Doutora Aura Colaço* pela disponibilidade de orientação e todo o apoio prestado no decorrer deste ano.

Ao *Professor Bruno Colaço* pela sua amizade, incentivo, boa disposição e conselhos.

À direção do Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, *Professor Doutor Valdemar Pedrosa* e *Professor Doutor Paulo Peixoto Igrejas*, pela coordenação do mestrado e pelos conhecimentos transmitidos.

À *Senhora Lígia Bento* pela simpatia e ajuda no processamento do material e realização dos cortes histológicos.

À *Dona Ana* pela sua alegria e conselhos no laboratório.

Aos colegas *Catarina*, *Ana* e *António* pelos esclarecimentos e ajuda prestada sempre que solicitada.

À *Maria-José* e *Manuel Rodrigues* que me apoiaram e incentivaram durante todos estes anos, por me aceitarem na sua família e ser hoje parte dela.

Aos meus pais, *António* e *Maria-José*, que nunca deixaram de acreditar em mim e me apoiaram toda a minha vida. Sou lhes eternamente agradecido.

À mulher da minha vida, *Liliana Rodrigues*, por ver sempre o melhor de mim. Pelo apoio, amor e compreensão que sempre me transmitiu. Por seres TU simplesmente, o meu muito obrigado.

RESUMO

A Luz Intensa Pulsátil (IPL) pode ser utilizada para vários fins, nomeadamente no fotorrejuvenescimento, na correção das alterações vasculares e da pigmentação, do acne, da remoção de tatuagens e evitar o crescimento do pelo. Os dispositivos IPL produzem um pulso de luz de duração muito curta e com comprimento de onda entre 500 e 1200nm, ocorrendo uma absorção seletiva pelos cromóforos presentes no tecido (hemoglobina, melanina e água) após a sua aplicação. A utilização doméstica destes dispositivos tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo escassos os estudos sobre os seus efeitos secundários. O objetivo deste estudo foi compreender a influência da luz pulsátil na pele normal e no desenvolvimento de lesões cutâneas pré-neoplásicas utilizando um modelo animal de dois estadios de cancro de pele. Foram utilizados murganhos fêmeas (n=28) da estirpe ICR (CD-1[®]), tendo sido constituídos 5 grupos: o grupo I foi submetido ao agente iniciador 7,12-dimetilbenzentraceno (DMBA), sem mais nenhum tratamento; o grupo II foi submetido a tratamento com IPL após iniciação pelo DMBA; o grupo III foi submetido a tratamento com o composto promotor da carcinogénese acetato de tetradecanoilforbol (TPA) após iniciação com o DMBA; o grupo IV foi exposto só a IPL e o grupo V foi o grupo de animais controlo, sendo exposto ao veículo, acetona. O procedimento experimental durou 25 semanas. A luz pulsátil foi aplicada na intensidade 5, correspondente a 6,5 J/cm², numa área de 6 cm². No final do procedimento experimental observaram-se 94 lesões proliferativas nos murganhos do grupo III (DMBA+TPA), sendo 87 papilomas e 7 carcinomas de células escamosas. A nível histológico, observou-se que a IPL não esteve associada ao desenvolvimento de neoplasias (grupo II e IV), verificando-se a presença de fibrose dérmica, o que parece confirmar a sua utilidade clínica no fotorrejuvenescimento. Por outro lado, no grupo II (DMBA+IPL) verificou-se hiperplasia focal da epiderme em 50% dos animais, resultado que poderá sugerir a IPL como agente promotor de carcinogénese. Consideramos fundamental a realização de estudos futuros no sentido de comprovar estes resultados e de verificar a hipótese da IPL constituir um potencial agente carcinogénico.

Palavras-chave: luz pulsátil, pele, murganho, fibrose, neoplasia

ABSTRACT

Intense Pulsed Light (IPL) may be used for various purposes, namely photo-renewal, correction of vascular alterations and pigmentation, acne, tattoo removal and for the prevention of the growth of hair. IPL devices produce a light pulse of very short duration and with a wavelength between 500 and 1200nm occurring a selective absorption by chromophores present in the tissue (hemoglobin, melanin and water) after its application. The use of these devices has increased significantly at a domestic level in recent years, and there are few studies about its side effects. The aim of this study was to understand the influence of pulsed light on normal skin and in the development of precancerous skin lesions using an animal model of two stages of skin cancer. Female mice were used (n = 28) of ICR strain (CD-1[®]) and they were incorporated into 5 groups: group I was subjected to initiator, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), without further treatment, group II was subjected to pulsed light treatment after the initiation by DMBA and group III was subjected to treatment with the compound of carcinogenesis promoter, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), after the DMBA initiation, group IV was exposed only to IPL and group V was the control group of animals, being exposed to acetone. The experimental procedure lasted 25 weeks. The IPL was applied at the intensity of 5, corresponding to a fluence of 6.8 J/cm² in an area of 6 cm². At the end of the experimental procedure 94 proliferative lesions in mice from group III (DMBA + TPA) were observed, being 87 papillomas and 7 squamous cell carcinomas. At a histological level, it was observed that the IPL was not linked to the development of neoplasia (Group II and IV), identifying the presence of dermal fibrosis, which appears to confirm its usefulness in clinical photorejuvenation. On the other hand, in Group II (DMBA + IPL) focal hyperplasia of epidermis in 50% of the animals was found, a result that may suggest that IPL can be a promoter of carcinogenesis. It should be considered essential to carry out further studies in order to confirm these results and to verify the hypothesis of the IPL as being a potential carcinogen.

Keywords: IPL, skin, mouse, fibrosis, cancer

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Cancro	1
1.1.1.	Cancro da pele	2
1.2.	Carcinogénese Química	3
1.2.1.	Agentes carcinogénicos	5
1.3.	Modelo Animal para o estudo do cancro da pele.....	6
1.4.	Luz Intensa Pulsátil	8
2.	OBJETIVOS	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1.	Animais.....	11
3.2.	Condições experimentais	11
3.3.	Identificação dos murganhos.....	11
3.4.	Protocolo experimental.....	12
3.5.	Pesagens	14
3.5.1.	Índice de homogeneidade ponderal (IHP)	14
3.5.2.	Ganho ponderal (GP)	14
3.6.	Avaliação do crescimento de tumores	14
3.7.	Sacrifício.....	15
3.8.	Processamento das amostras e análise histológica.....	15
3.9.	Análise Estatística	16
4.	RESULTADOS	17
4.1.	Aspeto geral dos animais durante o protocolo	17
4.2.	Índice de homogeneidade ponderal e ganho ponderal	17
4.3.	Variação do consumo de água e alimento	18
4.4.	Peso relativo e absoluto dos órgãos	18
4.5.	Avaliação macroscópica da pele	19
4.6.	Avaliação por microscopia de luz.....	22
5.	DISCUSSÃO	26
6.	CONCLUSÃO.....	33
7.	BIBLIOGRAFIA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1- Esquema representativo das diferentes etapas no desenvolvimento de carcinoma de pele, com a utilização dos agentes carcinogénicos DMBA e TPA (adaptado de Zoumpourlis <i>et al.</i> , 2003).....	4
Fig. 2- Esquema simplificado da classificação de compostos carcinogénicos químicos (adaptado de Oliveira, 2006).	6
Fig. 3- Representação esquemática da marcação utilizada para identificar os murganhos, observados caudo-cranialmente.....	12
Fig. 4- Máquina Philips Lumea® utilizada no protocolo experimental.....	12
Fig. 5- Procedimento experimental	13
Fig. 6- Representação gráfica do número de proliferações observados ao longo do ensaio experimental, no grupo III (DMBA+TPA).	20
Fig. 7- Lesões macroscópicas observadas no murganho 4 do grupo III (DMBA+TPA) na 12ª semana do procedimento experimental.	21
Fig. 8- Lesões macroscópicas observadas no murganho 4 do grupo III (DMBA+TPA) na 25ª semana do procedimento experimental, 5 dias antes do sacrifício.	21
Fig. 9- Imagens histológicas da pele representativas dos vários tratamentos experimentais realizados: pele sem alterações (tratamento com acetona, A e B), dermatite mononuclear difusa (tratamento com DMBA, C e D); fibrose dérmica (tratamento com IPL, E e F); dermatite ligeira e fibrose (G e H), associada a hiperplasia da epiderme (G) (tratamento DMBA+ IPL).....	23
Fig. 10- Imagens histológicas da pele representativas de lesões proliferativas após tratamento com DMBA/TPA: papiloma grau 1 (A), grau 2 (B) e grau 3 (C); CCE microinvasor (D-F); fibrose marcada do estroma adjacente a um papiloma (G) e a um CCE. HE (A-F); TM (G e H).....	25

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Peso final, inicial, ganho ponderal e índice de homogeneidade ponderal dos 5 grupos de murganhos.	17
Quadro 2- Variação do consumo médio de água e alimento.	18
Quadro 3- Média dos pesos relativos e absolutos dos órgãos dos diferentes grupos de murganhos.	19
Quadro 4- Número de lesões cutâneas observadas nas semanas 12,18 e 24 por murganho, no Grupo III (DMBA+TPA).	20
Quadro 5- Lesões proliferativas observadas em microscopia de luz nos diferentes grupos.....	22
Quadro 6- Lesões proliferativas cutâneas observadas no grupo III	24

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ANOVA	Análise de Variância
COX-2	Ciclo-Oxigenase-2
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
d.C.	depois de Cristo
DMBA	7,12-dimetilbenzentraceno
E	Eutanásia
EP	Erro Padrão
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GP	Ganho Ponderal
ICR	<i>Institute for Cancer Research</i>
IHP	Índice de Homogeneidade Ponderal
IPL	<i>Intense Pulsed Light</i> - Luz Intensa Pulsátil
IV	Infravermelha
MNNG	Metil-nitronitroso-guanidina
MNU	N-metil-N-nitrosureia
n	número
nm	nanómetro
P_f	Peso final
P_i	Peso inicial
PVH	Papiloma Vírus Humano
3 “Rs”	<i>Replace, Reduce and Refine</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TPA	Tetradecanoilforbol
TM	Tricrómio de Masson
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
$\bar{X}$	Média

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cancro

O cancro, inicialmente designado por “Karkinos”, é uma doença muito antiga descrita pela primeira vez por Hipócrates, no século IV a.C. (Guttierrez e Salsamendi, 2001). Este termo é utilizado para definir uma doença associada à proliferação anormal de células, que em determinados casos pode provocar a morte (Ruiz *et al.*, 2006). O conceito de neoplasia foi introduzido por Galeno, no século II, para descrever o crescimento excessivo de uma dada área do corpo, de forma irreversível e autónoma (Guttierrez e Salsamendi, 2001; Ruiz *et al.*, 2006). Atualmente, apesar de todos os esforços e investimento financeiro no sentido de controlar o cancro, esta doença provoca cerca de 7 milhões de mortes por ano, a nível mundial, o que a leva a ser considerada um dos maiores problemas de Saúde Pública (Greaves e Maley, 2012; Siegel *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos da América, o cancro provoca uma em cada quatro mortes e na Europa é responsável por 24% da mortalidade geral (Merletti *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2012). Um estudo estatístico recente, efetuado nos Estados Unidos da América, prevê que este ano ocorram 1,6 milhões de novos casos de cancro e cerca de 577190 mortes, isto é, mais de 1500 mortes por dia. Estima-se que o cancro do pulmão seja o mais mortal e comum (Siegel *et al.*, 2012), considerando-se que o aumento da incidência do cancro está diretamente relacionado com o aumento da esperança média de vida (Bertram, 2001; Ruiz *et al.*, 2006).

Existem vários tipos de cancro, sendo que a sua incidência em determinados órgãos ou tecidos varia de acordo com a localização geográfica (Tanaka, 1997). Uma das características desta doença é o facto de a sua evolução variar de pessoa para pessoa, estando dependente dos fatores etiológicos ou da herança genética individual (Kemp, 2005).

São vários os fatores etiológicos implicados no desenvolvimento do cancro (Colditz, 2001): tabaco, dieta, poluição ambiental, radiação ionizante e ultravioleta, parasitas e vírus (por exemplo, o papiloma vírus humano (PVH), que contribui para o desenvolvimento do cancro do útero), entre muitos outros (Husting *et al.*, 1999; Colditz, 2001).

A biopatologia do cancro está associada a alterações genéticas que se traduzem no aumento da proliferação celular e na diminuição da apoptose (Gu *et al.*, 2005; Kemp, 2005; Ruiz *et al.*, 2006). O corpo humano é constituído por aproximadamente 10^{15} células, entre as quais se destacam as células estaminais, com capacidade de se dividir 10^{12} vezes por dia (Bertram, 2001). Os processos de divisão e proliferação celular são controlados por uma rede de mecanismos moleculares, de entre os quais se destacam *checkpoints* de reparação e de

apoptose (Bertram, 2001; Jiang e Mansel, 2004; Gu *et al.*, 2005). Quando ocorre uma lesão ao nível do ácido desoxirribonucleico (ADN) da célula, se aquela não for reparada (apesar de identificada pelos *checkpoints*), os mecanismos de apoptose serão ativados. Desta forma, evitar-se-á a replicação de ADN mutado, impedindo a perpetuação da mutação na informação genética da célula-filha (Jiang e Mansel, 2004; Gu *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2006). Caso os mecanismos de controlo falhem, esta célula diz-se iniciada e poderá vir a originar uma neoplasia (Gu *et al.*, 2005).

1.1.1. Cancro da pele

O cancro da pele é muito comum nos Estados Unidos da América, contudo é na Austrália que ocorre a maior taxa de doentes oncológicos com este tipo de neoplasia (Stanton *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2008). A nível europeu, os países do sul, como é o caso de Portugal, Grécia, Espanha e Itália, são os que apresentam um maior número de casos de cancro da pele (Boyle *et al.*, 2004). A exposição à radiação ultravioleta (UV), proveniente da luz solar ou de fontes artificiais, pode provocar graves problemas de saúde, e entre elas o desenvolvimento desta doença oncológica (Colditz, 2001; Stanton *et al.*, 2004; Tuohimaa *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2008; Weir *et al.*, 2011). A radiação UV pode ser dividida em 3 bandas: UVA, UVB e UVC, com comprimentos de onda a variar entre os 320-400 nm, 290-320 nm e 200-290 nm, respetivamente (Colditz, 2001) e várias publicações definem a radiação UVB como a mais perigosa (Colditz, 2001; Tuohimaa *et al.*, 2004; Sand *et al.*, 2010).

Existem dois tipos de cancro de pele: melanoma e não melanoma. No segundo tipo, destacam-se o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas (Colditz, 2001; Ericson *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2008). Ambos constituem neoplasias malignas, sendo o carcinoma basocelular considerado o mais comum, mas menos mortal, e o carcinoma de células escamosas considerado como o mais agressivo e letal. O melanoma é o tipo de cancro da pele mais fatal (Colditz, 2001; Lieber *et al.*, 2009; Gerstenblith *et al.*, 2012; Maio, 2012).

Os diferentes tipos de cancro da pele são mais comuns em indivíduos de pele clara (especialmente jovens mulheres) do que em negros, uma vez que nestes a melanina minimiza a absorção da radiação UV (Colditz, 2001; Tuohimaa *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2011; Gerstenblith *et al.*, 2012). Os locais mais susceptíveis ao desenvolvimento de cancro da pele nos indivíduos brancos são os mais expostos ao sol: face, ombros, pescoço e extremidades, podendo também afetar áreas de inflamação crónica e cicatrizes (Colditz, 2001; McGillis e Fein, 2004). O cancro da pele ao nível do nariz e do lábio tem-se tornado mais comum, visto

que são zonas permanentemente expostas à radiação solar e o nariz se encontra num ângulo agudo, que favorece a absorção da luz (Sand *et al.*, 2010; Grant, 2012). No caso dos indivíduos negros, os locais mais susceptíveis a sofrerem danos deste tipo são os que não estão expostos à radiação solar (McGillis e Fein, 2004). É de referenciar que pessoas com um sistema imunitário alterado/deficiente, ou sujeitas a transplante de órgãos, são cerca de 40% mais vulneráveis a desenvolverem esta doença (Colditz, 2001; Ericson *et al.*, 2008).

O diagnóstico é muito importante neste e em qualquer tipo de cancro, pois quanto mais precoce, mais sucesso terá o tratamento (Colditz, 2001; Wollina, 2012). O ideal é proceder a uma autoavaliação dos sinais cutâneos tendo em conta a “regra ABCD”, ou seja, observando a área, bordo, cor e diâmetro do sinal.

1.2. Carcinogénese Química

A carcinogénese química é definida como a indução de neoplasias, em um ou vários órgãos ou tecidos, por ação de um agente químico também designado de agente carcinogénico (Butterworth *et al.*, 1992).

A carcinogénese é um processo complexo, constituído por 3 etapas (Fig. 1): iniciação, promoção e progressão (Foulds, 1954; Cohen, 1991; Loeb e Harris, 2008; Kaur *et al.*, 2009). Inicialmente foi caracterizada por Berenblum e Shubik, em 1947, num estudo de carcinogénese química utilizando hidrocarbonetos aromáticos e óleo de cróton na pele de murganhos, como sendo um processo que envolvia apenas duas fases: a iniciação e a promoção (Berenblum e Shubik, 1947). Na fase de iniciação, ocorre um dano irreversível ao nível do ADN, enquanto a promoção se caracteriza pela expansão clonal da célula transformada, após a ação de um agente promotor. Os agentes carcinogénicos podem ser iniciadores ou promotores. O 7,12-dimetilbenzentraceno (DMBA) é frequentemente utilizado, em ensaios experimentais de cancro da pele, como agente iniciador e o acetato de tetradecanoilforbol (TPA) como promotor (Abel *et al.*, 2009). Os agentes iniciadores produzem danos no ADN irreversíveis. São reativos com o ADN diretamente ou através de ativação metabólica (genotóxicos). Os agentes promotores são químicos não reativos com o ADN produzindo efeito pelo aumento da proliferação celular (não genotóxicos) (Abel *et al.*, 2009).

Em 1954, Foulds, ao estudar o adenocarcinoma da glândula mamária em murganhos fêmeas, verificou que existia uma fase adicional, posterior a estas duas, designando-a de progressão (Foulds, 1954; Homburger, 1969). A progressão resulta da transformação das

lesões benignas em lesões malignas, causada pela acumulação sucessiva de alterações genéticas, associadas à proliferação celular descontrolada. Esta fase é irreversível, caracterizando-se por um aumento da instabilidade genética, associada a modificações celulares bioquímicas, morfológicas e metabólicas, podendo verificar-se metastização regional e à distância (Klaunig *et al.*, 2000; Dixon e Kopras, 2004; Kanojia e Vaidya, 2006).

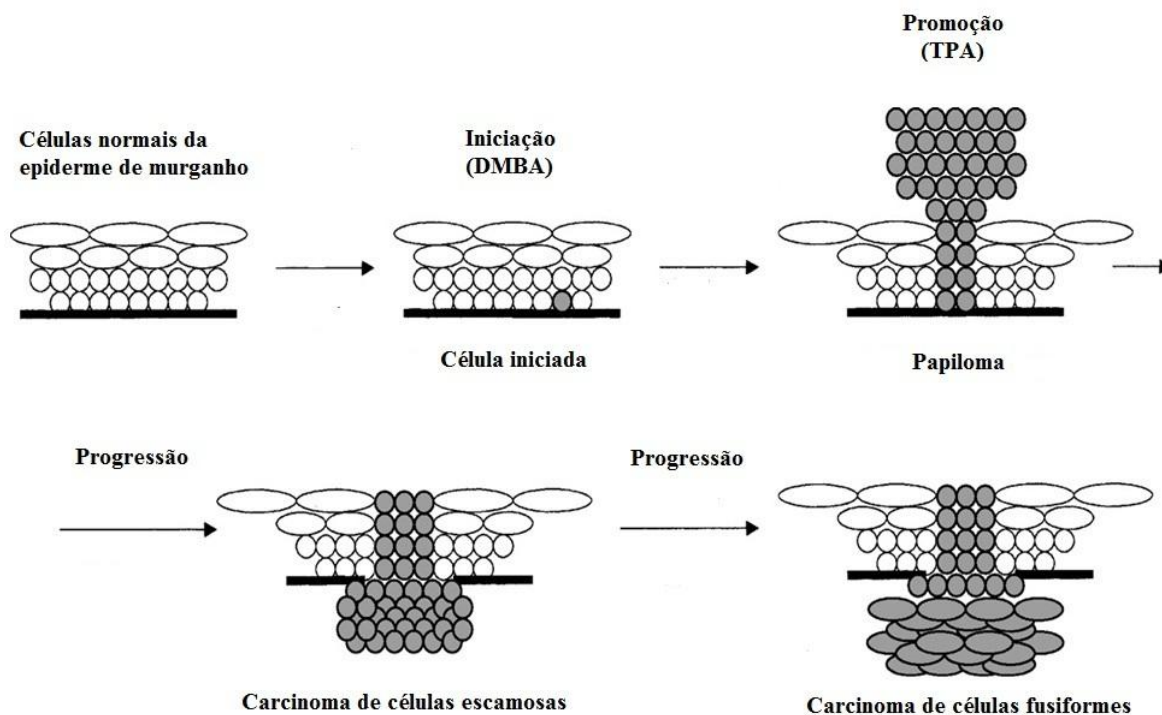


Fig. 1- Esquema representativo das diferentes etapas no desenvolvimento de carcinoma de pele, com a utilização dos agentes carcinogénicos DMBA e TPA (adaptado de Zoumpourlis *et al.*, 2003).

Vários foram os estudos epidemiológicos e experimentais que permitiram identificar os vários compostos cancerígenos (Bertram, 2001; Loeb e Harris, 2008). Em 1761, John Hill observou que os indivíduos que inalavam rapé tinham mais probabilidade de vir a desenvolver cancro nas fossas nasais. Mais tarde, Percivall Pott observou que os limpa-chaminés londrinos desenvolviam cancro no escroto devido à exposição à fuligem e alcatrão do carvão, estabelecendo, assim, uma relação entre a exposição a substâncias químicas e o desenvolvimento de cancro (Loeb e Harris, 2008). No século XX verificou-se que utilizando

animais em trabalhos experimentais podia estudar-se com mais eficácia o efeito dos compostos químicos suspeitos de terem propriedades carcinogénicas (Loeb e Harris, 2008). O primeiro trabalho de experimentação animal de carcinogénese química foi executado por Yamagiwa e Ishikawa, em 1918. Estes cientistas japoneses friccionaram repetidamente carvão nas orelhas de coelhos e verificaram que estes animais desenvolviam papilomas e carcinomas cutâneos, o que comprovava que o carvão tinha substâncias químicas consideradas perigosas para a saúde humana (Bertram, 2001; Toth, 2001; Loeb e Harris, 2008). A maioria dos compostos carcinogénicos só foi reconhecida como tal após estudos realizados com animais de laboratório. Contudo, há que ter em consideração, para o Homem, a influência de fatores exógenos (hábitos alimentares, estilo de vida, agentes físicos e biológicos e compostos químicos) e endógenos (sistema imunológico deficiente, características genéticas e idade) na susceptibilidade individual à exposição aos agentes carcinogénicos (Maranpot, 1996; Guttierrez e Salsamendi, 2001; Waddell, 2002).

1.2.1. Agentes carcinogénicos

Um agente carcinogénico é um composto que possui a capacidade, sob condições apropriadas, de desencadear o desenvolvimento de neoplasias no Homem e restantes espécies animais (Goldsworthy *et al.*, 1993; Melnick *et al.*, 1996). Um composto químico é classificado como carcinogénico se num ensaio experimental induzir neoplasias em número estatisticamente significativo, comparativamente aos animais não expostos ao agente químico em estudo (Guttierrez e Salsamendi, 2001).

A classificação dos agentes carcinogénicos é difícil e não consensual. Os agentes carcinogénicos químicos podem ser classificados como diretos ou indiretos: um agente carcinogénico direto caracteriza-se por não necessitar de ativação metabólica, enquanto um carcinogénico indireto, também designado de pró-carcinogénico, requer ativação metabólica para exercer o seu mecanismo de ação (Butterworth *et al.*, 1992; Williams, 2001). Da ativação metabólica fazem parte uma série de reações enzimáticas hepáticas, classificadas em reações de fase I e de fase II (Guengerich, 2000; Park *et al.*, 2005).

Por outro lado, outros autores classificam o agente carcinogénico químico em função da sua intervenção nas etapas da carcinogénese ou de acordo com o seu mecanismo de ação (Gonzalez, 2001 e Oliveira, 2006). Os investigadores que descrevem os compostos segundo as etapas da carcinogénese organizam-nos em iniciadores ou promotores. Um composto é descrito como iniciador se tem a capacidade de iniciar uma célula, criando um defeito ao nível

do seu ADN. Em contrapartida, um composto promotor induz a célula a multiplicar-se. Já um composto completo, dependendo da dose e do tempo de exposição, possui em simultâneo propriedades de iniciador e promotor (Farmer, 1994; Trosko, 2001). Os compostos químicos são também classificados em função do seu mecanismo de ação (Fig. 2) em genotóxicos e não genotóxicos (Goldsworthy *et al.*, 1993; Melnick *et al.*, 1996; Gonzalez, 2001). Os compostos genotóxicos caracterizam-se por estabelecer ligações químicas com o ADN designadas de adutos; por outro lado, os compostos não genotóxicos não formam adutos com o ADN. Os compostos não genotóxicos modulam o crescimento e a morte celular (Farmer, 1994; Melnick *et al.*, 1996; Williams, 2001). A distinção entre os diferentes compostos carcinogénicos químicos baseia-se na capacidade que cada um tem em interagir com o ADN. Os compostos carcinogénicos químicos não reativos com o ADN aumentam o risco de desenvolvimento de cancro por estimularem a proliferação celular nas células-alvo (Cohen e Arnold, 2011).

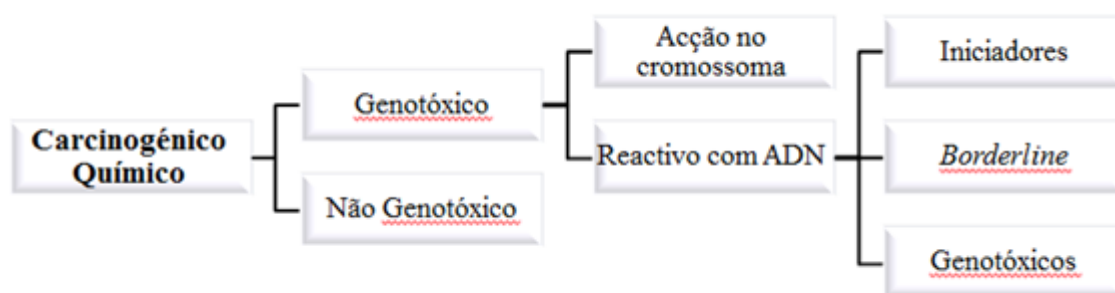


Fig. 2 - Esquema simplificado da classificação de compostos carcinogénicos químicos (adaptado de Oliveira, 2006).

1.3. Modelo Animal para o estudo do cancro da pele

A utilização de animais em trabalhos de laboratório existe desde o século V a.C., quando Hipócrates recorreu a animais para comparar os órgãos dos animais com os órgãos do Homem doente e conseguir obter conhecimentos sobre a saúde. Mais tarde, Galeno, entre 131-201 d.C. foi o precursor das ciências médicas experimentais, ao realizar vários testes médicos em animais (Raymond e Goldim, 2002).

Ao longo dos anos, os ensaios experimentais com animais permitiram-nos estabelecer critérios, classificar potenciais agentes tóxicos, assim como estudar características farmacológicas e estabelecer a relação dose-resposta a possíveis agentes terapêuticos (Steele e Lubet, 2010). Tendo em conta as vantagens da utilização de animais em estudos experimentais, a partir de 1800 verificou-se um crescimento da sua utilização, o que

favoreceu a criação de associações ou sociedades protetoras de animais utilizados com fins experimentais (Raymond e Goldim, 2002).

Atualmente, o recurso a animais para estudos científicos exige que seja tida em conta a política dos 3 “Rs” (*replace, reduce and refine*) (Raymond e Goldim, 2002; Steele e Lubet, 2010). É também importante considerar alguns parâmetros-chave na escolha de um modelo animal. No caso dos ensaios experimentais oncológicos consideram-se os seguintes pontos:

- a neoplasia deve ser induzida nos tecidos-alvo pretendidos;
- o modelo deve ser económico;
- as alterações genéticas das lesões induzidas devem ser similares às do Homem;
- o modelo a realizar deve ser de fácil execução e previsibilidade (Steele *et al.*, 2005; Steele e Lubet, 2010).

Uma das estirpes de animal de experimentação mais adequada para estudos de indução de cancro da pele é o murganho ICR (*Institute for Cancer Research*) (Harlan, 2012; Manenti *et al.*, 2003). Os murganhos transgénicos (TgAC ou TgRasH2) caracterizam-se por responderem eficazmente aos agentes carcinogénicos cutâneos; contudo, podem sofrer uma mutação incomum no Homem, o que pode dificultar a extrapolação de resultados entre as duas espécies (Lynch *et al.*, 2007).

Na indução experimental de cancro da pele no murganho podem utilizar-se dois protocolos: o modelo de carcinogénese em duas etapas ou o de carcinogénese completa. O modelo de carcinogénese em duas etapas permite separar a fase de iniciação da fase de promoção, bem como monitorizá-las ao longo de um ensaio experimental (Abel *et al.*, 2009). A primeira etapa da indução experimental das neoplasias cutâneas é iniciada recorrendo a um agente químico mutagénico com propriedades de iniciador, sendo aplicada apenas uma dose (Harlan, 2012; Manenti *et al.*, 2003). O agente químico mais utilizado como iniciador é o 7,12-dimetilbenzentraceno (DMBA); contudo, podem ser utilizados outros compostos como a metil-nitronitroso-guanidina (MNNG), a N-metil-N-nitrosureia (MNU), a cisplatina, o benzo[a]pireno, a β -propiolactona e a radiação UV (Abel *et al.*, 2009). Para promover o desenvolvimento de neoplasias cutâneas aplica-se repetidamente, ao longo de 20 semanas, um agente promotor, sendo o acetato de tetradecanoilforbol (TPA) um dos mais utilizados (Manenti *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2009). Outros compostos utilizados como promotores são a radiação UV, a crisaborina e o peróxido de benzoílo (Abel *et al.*, 2009).

1.4. Luz Intensa Pulsátil

A primeira fonte de Luz Intensa Pulsátil (*Intense Pulsed Light*, IPL), *Photoderm*, foi criada em 1985, sendo constituída por lâmpadas de cloreto que produzem um impulso muito curto e incoerente, mas intenso (Stangl *et al.*, 2008). A IPL caracteriza-se por produzir uma luz com um intervalo de duração muito curto e não coerente, como um pulso, com um comprimento de onda que varia entre os 500 e os 1200nm (Chan *et al.*, 2007; Babilas *et al.*, 2010; Lu, 2010). A IPL pode ser utilizada para vários tratamentos com diferentes objetivos: no fotorrejuvenescimento, na correção das alterações vasculares e da pigmentação cutânea, no tratamento de acne, na remoção de tatuagens e na redução do crescimento do pelo (Chan *et al.*, 2007; Babilas *et al.*, 2010).

Têm vindo a desenvolver-se dispositivos baseados em IPL, de fácil uso doméstico e sem ser necessário treino prévio antes da sua utilização (Town e Ash, 2010). De facto, atualmente existem numerosos tipos de dispositivos de IPL à venda no mercado, previamente configurados com a duração fixa do pulso e com baixo consumo de energia, permitindo ao utilizador maior privacidade e adaptação personalizada às sessões de tratamento (Babilas *et al.*, 2010; Town e Ash, 2010). Este tipo de dispositivo é, normalmente, constituído por uma lâmpada com um tubo de quartzo associado a uma mistura de gases e por um eléctrodo que transporta a corrente. O pulso da luz ocorre devido à corrente eléctrica enviada para o tubo, que excita os electrões em volta dos átomos dos gases, elevando-os a níveis mais elevados de energia (Stangl *et al.*, 2008). Quando os átomos estão excitados, emitem luz em várias linhas espectrais, mas num intervalo de tempo muito curto, na gama dos microssegundos (Stangl *et al.*, 2008; Babilas *et al.*, 2010).

Na remoção do pelo, este tipo de aparelho funciona à base de tratamento por fototermólise, provocando uma lesão na derme devido à absorção seletiva da luz pelos cromóforos existentes no tecido (hemoglobina, melanina e água), que a convertem em calor (Hedelund *et al.*, 2006; Stangl *et al.*, 2008; Lu, 2010; Town e Ash, 2010). A energia libertada, num comprimento adequado, vai aquecer o pelo e o bulbo capilar até temperaturas compreendidas entre os 65-70°C, acabando por queimá-lo e evitando que este volte a crescer (Town e Ash, 2010). A utilização deste equipamento deve ser ajustada à área a depilar (Stangl *et al.*, 2008; Babilas *et al.*, 2010).

Apesar de, em 1976, Muhlbauer ter descrito pela primeira vez a utilização de luz infravermelha (IV) policromada para o tratamento de malformações vasculares, foi graças aos estudos executados por Anderson e Parrish, em 1983, que se estabeleceram os princípios da fototermólise seletiva, permitindo desenvolver tratamentos dermatológicos envolvendo a

utilização do laser, como é o caso dos dispositivos IPL (Stangl *et al.*, 2008; Babilas *et al.*, 2010).

Atualmente, a maioria dos aparelhos de IPL já vêm preparados com sensores que garantem uma descarga energética apenas quando o aparelho está em contacto com a pele, evitando a utilização de óculos de segurança. No entanto, antes de qualquer tipo de utilização da IPL, para garantir um tratamento adequado e evitar complicações, deve-se considerar: existência de implantes; doenças como a diabetes, hemofilia ou outra coagulopatia; limpeza da área de tratamento (removendo-se a maquilhagem e cortando previamente o pelo) (Babilas *et al.*, 2010) e a identificação do tipo de pele e pelo (sendo menos eficaz para pele e pelos claros) através da escala de Fitzpatrick. Esta escala permite classificar a pele em 6 tipos diferentes, tendo em conta a sua cor e as reações desta à exposição solar. Num extremo (pele tipo I) definem-se as pessoas com tom da pele muito claro e no outro (pele tipo VI) as pessoas com tom da pele muito escuro. Esta escala ajuda na prevenção do risco do fotoenvelhecimento e do cancro da pele (Sachiva, 2009).

Caso o utilizador esteja gestante ou a amamentar, possua doença ou condição genética relacionadas com fotossensibilidade, necessite da ingestão de medicamentos fotossensibilizantes ou retinóides ou caso esteja bronzeado, não deve ser utilizado este tipo de dispositivo (Stangl *et al.*, 2008; Babilas *et al.*, 2010). É também aconselhável, após o tratamento, evitar a exposição ao sol durante cerca de 8 semanas, sob o risco de surgirem manchas por hiperpigmentação na zona depilada (Babilas *et al.*, 2010).

Os principais efeitos secundários causados pela incorreta utilização dos dispositivos IPL são: dor durante o tratamento, edema, podendo surgir vesículas/bolhas ou crostas, que podem favorecer a ocorrência de infeções ou cicatrizes (Chan *et al.*, 2007; Stangl *et al.*, 2008; Babilas *et al.*, 2010). Outros efeitos secundários descritos nos tratamentos com este tipo de dispositivos são: a hiperpigmentação cutânea, causada por excesso de densidade de energia, e a hipopigmentação cutânea, causada pela reduzida densidade de energia, que causa danos permanentes nos melanócitos (Moreno-Arias *et al.*, 2002; Stangl *et al.*, 2008).

Ainda não se conhecem as complicações da utilização da IPL a longo prazo, nem os efeitos que a IPL pode ter sobre lesões cutâneas pré-neoplásicas ou neoplásicas, pelo que consideramos importante estudar os efeitos que a IPL pode ter nestas circunstâncias.

2. OBJETIVOS

Tendo em consideração a utilização crescente de dispositivos IPL e uma vez que não existem estudos da sua influência a longo prazo ao nível da pele, nem os seus efeitos em lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, pretende-se, com este trabalho:

- Compreender a influência da luz pulsátil ao nível da pele normal;

- Compreender a influência da luz pulsátil no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas utilizando um modelo animal de dois estadios de cancro de pele.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para este protocolo experimental foram utilizados 28 murganhos, da espécie *Mus Musculus*, estirpe ICR (CD-1[®]), do sexo feminino, com cerca de 5 semanas de idade, adquiridos à empresa Harlan-Interfauna (Barcelona, Espanha).

Antes de iniciar o protocolo, os animais foram mantidos em quarentena durante um período de 6 semanas. Os murganhos foram distribuídos ao acaso por 5 grupos, sendo os grupos I e V constituídos por 5 animais e os restantes grupos por 6 animais.

3.2. Condições experimentais

Os murganhos foram colocados em gaiolas de polycarbonato revestidas com carolo de milho. Para o enriquecimento ambiental colocaram-se tubos de plástico duro e rolos de papel. Cada gaiola foi identificada com uma etiqueta na qual constou o número do grupo, o tratamento a realizar e o número de murganhos. A água e alimento foram disponibilizados *ad libitum*. A ração comercial Teklad Global Diet-Harlan[®] foi adquirida à empresa Harlan-Interfauna, de Espanha. A cama dos animais foi constituída por carolo de milho. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Veterinárias, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, com o controlo da temperatura a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade relativa de $55\pm 5\%$ e luminosidade diária de 12 horas. As gaiolas foram lavadas quinzenalmente e a cama mudada uma vez por semana.

3.3. Identificação dos murganhos

A identificação dos murganhos foi efetuada individualmente através da realização de cortes triangulares nas orelhas, como representado na Fig. 3, quando observados da cauda para a cabeça.

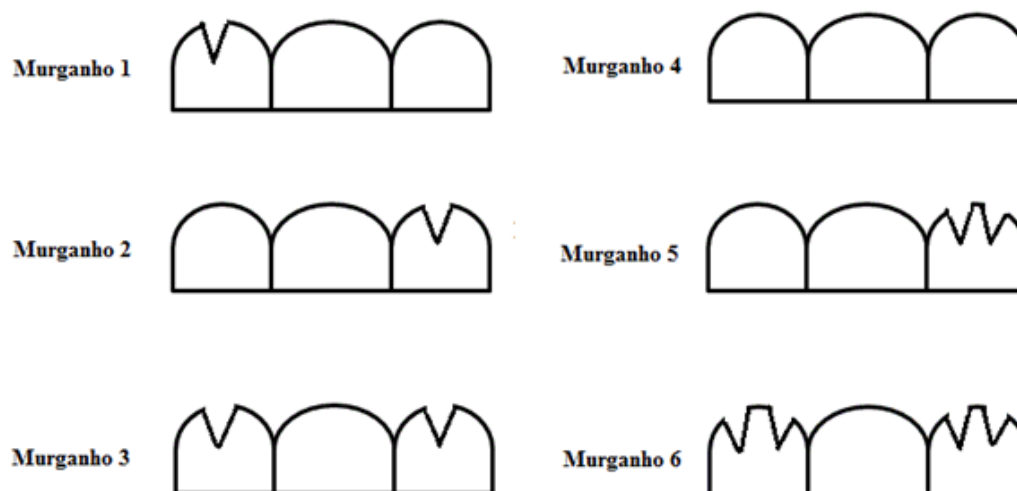


Fig. 3 – Representação esquemática da marcação utilizada para identificar os murganhos, observados caudo-cranialmente.

3.4. Protocolo experimental

Antes de iniciar-se o procedimento experimental, os compostos químicos carcinogénicos DMBA (7,12-dimetilbenzentraceno) e TPA (acetato de tetradecanoilforbol), adquiridos à empresa Sigma-Aldrich[®], foram preparados com 1,75mg diluídos em 3,4ml (400 nmol/ 200 μ l) e 3mg em 48,6ml (10 nmol/100 μ l) de acetona (veículo), respetivamente. Os compostos carcinogénicos foram conservados a -20°C e divididos em doses, para serem administrados ao longo do protocolo experimental. O aparelho da marca Philips Lumea[®] foi utilizado para a emissão de luz pulsátil, na intensidade 5, correspondente a uma fluência de 6,5J/cm² numa área de 6cm² (Fig. 4).



Fig. 4 – Máquina Philips Lumea[®] utilizada no protocolo experimental.

O protocolo para a manutenção dos animais, indução das neoplasias da pele e sacrifício foi realizado em conformidade com a Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro, e com os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia para o Bem Estar Animal.

O protocolo experimental iniciou-se com o corte do pelo no dorso de todos os murganhos, sendo os tratamentos efetuados nesta região. O corte do pelo foi efetuado quinzenalmente, com uma máquina de tosquia (Braun, modelo AESCULAP, Isis GT 420).

Nos murganhos do grupo I, II e III foi efetuada uma aplicação única do iniciador, uma semana após o corte do pelo. No grupo III, passados 4 dias após a aplicação do iniciador, passou a aplicar-se o TPA, duas vezes por semana, durante 25 semanas (179 dias). Os animais dos grupos II e IV foram submetidos a 2 pulsos de luz pulsátil com intensidade 5, duas vezes por semana e durante todo o protocolo. Os pulsos foram aplicados paralelamente à linha sagital do dorso dos murganhos fêmea. Aos animais do grupo IV aplicou-se apenas a luz pulsátil e no grupo V foi aplicada acetona duas vezes por semana até ao fim do ensaio (Fig. 5). Utilizou-se este composto uma vez que este funcionava como veículo do composto DMBA e TPA, permitindo assim estudar o seu efeito na pele saudável. O TPA e DMBA foram aplicados sobre o dorso dos animais numa câmara de fluxo laminar, devido a forte possibilidade de evaporação destes agentes carcinogénicos.

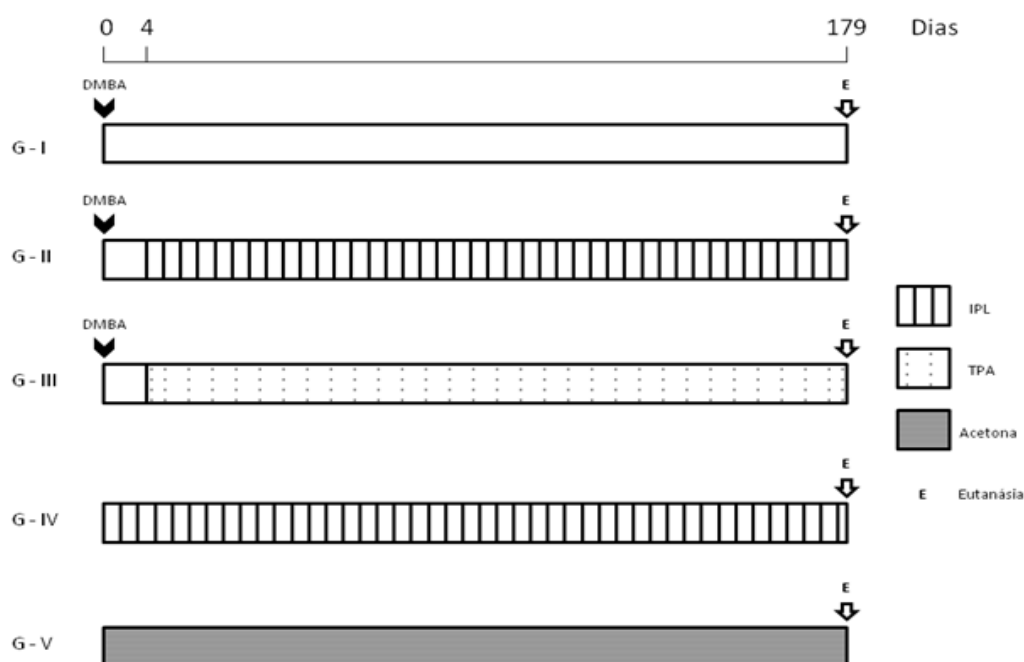


Fig. 5 - Procedimento experimental

3.5. Pesagens

Foram realizadas pesagens individuais aos murganhos no início da experiência e antes do sacrifício dos mesmos. Semanalmente, efetuaram-se pesagens a cada grupo no seu conjunto, assim como à água e ao alimento ingerido, de forma a controlar as variações de peso dos animais e o consumo de alimentação e bebida. Para esse efeito, utilizou-se uma balança Mettler PM 4000.

3.5.1. Índice de homogeneidade ponderal (IHP)

Para cada grupo foi calculado, no início do trabalho experimental, o índice de homogeneidade ponderal, utilizando o peso inferior (P_i) e o peso superior (P_s) de cada grupo, segundo a seguinte fórmula:

$$IHP = 2 P_i (P_i + P_s)$$

3.5.2. Ganho ponderal (GP)

Para cada grupo foi calculado o ganho ponderal em que P_i corresponde ao peso inicial e P_f ao peso final, segundo a seguinte fórmula:

$$GP = (P_f - P_i) / P_i * 100$$

3.6. Avaliação do crescimento de tumores

Todos murganhos do ensaio experimental foram observados uma vez por semana para identificar e registar a ocorrência de alterações cutâneas no local da aplicação dos diferentes tratamentos. Nos casos em que se identificaram lesões proliferativas papilomatosas, procedeu-se ao seu registo.

3.7. Sacrifício

Terminado o período de experimentação, os animais foram sacrificados pela administração intraperitoneal de uma *overdose* de xilazina (Rompum), seguida de exsanguinamento por punção intracardíaca.

Após a eutanásia dos animais foram recolhidos os seguintes órgãos para análise histológica: toda a pele da região dorsal, coração, pulmão, rins, fígado e baço. Antes de serem colocados os órgãos em formol tamponado a 10% todos os órgãos foram pesados individualmente numa balança de precisão A&D HR-200.

3.8. Processamento das amostras e análise histológica

O material foi fixado em formol tamponado a 10% e processado de acordo com o procedimento de rotina para a microscopia de luz. Dos blocos de parafina foram realizados cortes de 2µm de espessura num micrótomo de rotação Leica® 20035; as preparações foram desparafinadas em xilol, hidratadas numa série de álcoois de concentração decrescente e coradas pelo método convencional de Hematoxilina-Eosina, após o qual se procedeu à avaliação histológica. Foram avaliadas as alterações ao nível da pele (epiderme e derme), assim como dos restantes órgãos acima referidos.

As lesões proliferativas cutâneas foram classificadas em papiloma (grau 1 a 3) ou carcinoma de células escamosas microinvasor ou invasor, de acordo com a classificação proposta por Thomas-Ahner e seus colaboradores (2007). Foram considerados como papilomas as neoplasias epiteliais exofíticas, sem evidência de invasão estromal. Um papiloma grau 1 é composto essencialmente por epitélio, sem um padrão papilar pronunciado; um papiloma grau 2 é uma proliferação papilar bem diferenciada; o papiloma grau 3 é semelhante ao anterior, com a exceção da existência de projeções digitiformes de células epiteliais atípicas na base da neoplasia. Os carcinomas de células escamosas caracterizam-se por uma morfologia frequentemente endofítica, caracterizada por invasão estromal. Apenas os carcinomas com invasão do *panniculus carnosus* são classificados como carcinoma de células escamosas invasor. O *panniculus carnosus* é uma camada fina de músculo que separa a pele do murganho das estruturas adjacentes.

Para a avaliação da fibrose dérmica foi efetuada a coloração Tricrómio de Masson, que evidencia as fibras de colagénio (Masson, 1976).

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, IL, USA), versão 20. As diferenças entre os valores do corpo e peso dos órgãos foram determinados em todos os animais. Os pesos relativos dos órgãos também foram calculados usando a razão entre o peso dos órgãos e o peso corporal. Os dados paramétricos foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Os valores obtidos foram considerados como significativos para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Aspeto geral dos animais durante o protocolo

Durante todo o procedimento experimental, nenhum murgancho morreu e todos mantiveram um bom estado geral.

4.2. Índice de homogeneidade ponderal e ganho ponderal

Tendo em consideração o peso inicial e final dos diferentes grupos de murganchos utilizados no ensaio experimental, calculou-se o índice de homogeneidade ponderal (IHP) e o ganho ponderal (GP) (Quadro 1). Observou-se que os grupos I, II e IV tiveram maior variação de IHP ($IHP \geq 0,90$), ao contrário do grupo III e V ($IHP = 0,80$). Em relação ao GP, observou-se que foi maior no grupo V e menor no grupo III. A variação do GP entre o grupo V ($28,09 \pm 4,18$) e o grupo III ($6,85 \pm 5,52$) foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Quadro 1 - Peso final, inicial, ganho ponderal e índice de homogeneidade ponderal dos 5 grupos de murganchos.

($\bar{X}$ - média ; EP- erro padrão)

Grupo	Tratamento	Peso inicial (g) $\bar{X} \pm EP$	Peso final (g) $\bar{X} \pm EP$	IHP	Ganho ponderal (%) $\bar{X} \pm EP$
I	DMBA	34,54 $\pm$ 0,93	43,33 $\pm$ 1,40	0,92	20,07 $\pm$ 2,49
II	DMBA+IPL	35,44 $\pm$ 0,72	41,90 $\pm$ 1,11	0,92	15,18 $\pm$ 2,49
III	DMBA+TPA	34,58 $\pm$ 0,76	37,86 $\pm$ 2,63*	0,80	6,85 $\pm$ 5,52*
IV	IPL	34,31 $\pm$ 1,34	41,93 $\pm$ 1,26	0,90	17,91 $\pm$ 3,43
V	Acetona	35,21 $\pm$ 1,96	49,75 $\pm$ 3,71	0,80	28,09 $\pm$ 4,18

* Estatisticamente significativo ($p < 0,05$) relativamente ao grupo V.

DMBA- 7,12 dimetilbenzentraceno; IPL – Luz intensa pulsátil; TPA – acetato de tetradecanoiforbol

4.3. Variação do consumo de água e alimento

Os valores obtidos como variação de consumo médio de água e alimento, demonstram que com exceção do grupo II, que no final consumiu mais água, não houve grandes variações (Quadro 2).

Quadro 2 –Variação do consumo médio de água e alimento.

Grupo	Tratamento	Consumo inicial de comida	Consumo final de comida	Consumo inicial de água	Consumo final de água
I	DMBA	4,86	4,82	6,33	7,94
II	DMBA+IPL	6,00	4,63	3,58	7,99
III	DMBA+TPA	4,30	5,41	9,54	9,53
IV	IPL	5,46	4,62	6,22	6,75
V	Acetona	4,92	5,11	7,09	8,24

DMBA- 7,12 dimetilbenzentraceno; IPL – Luz intensa pulsátil; TPA – acetato de tetradecanoiforbol

4.4. Peso relativo e absoluto dos órgãos

Relativamente à média relativa do peso dos órgãos, observou-se que todos os órgãos com exceção do baço e fígado, tinham um peso inferior ao do grupo III, comparativamente com os outros grupos, como se pode verificar no Quadro 3.

Quadro 3— Média dos pesos relativos e absolutos dos órgãos dos diferentes grupos de murganhos.($\bar{X}$ -média; EP-erro padrão)

		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
		$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$	$\bar{X} \pm EP$
Média de peso absoluto	Coração	0,2262±0,0152	0,2013±0,0044	0,1996±0,0146	0,2127±0,0119	0,2120±0,0128
	Pulmão	0,3153±0,0365	0,3193±0,0406	0,3060±0,0269	0,3546±0,0452	0,3311±0,0199
	Rim	0,2655±0,0125	0,2837±0,0180	0,2472±0,0099	0,2886±0,0137	0,3108±0,0335
	Direito					
	Rim	0,2840±0,0117	0,2707±0,0150	0,2777±0,0211	0,2995±0,0156	0,3374±0,0297
	Esquerdo					
	Baço	0,1572±0,0138	0,1771±0,0188	0,4858±0,2268	0,1662±0,0041	0,1686±0,0120
	Fígado	1,9943±0,1211	1,9681±0,1168	2,1353±0,2021	1,9284±0,0867	2,2413±0,1977
Média de pesos relativos	Coração	0,0052±0,0003	0,0048±0,0002	0,0053±0,0002	0,0051±0,0003	0,0043±0,0002
	Pulmão	0,0074±0,0010	0,0077±0,0011	0,0081±0,0004	0,0086±0,0013	0,0067±0,0005
	Rim	0,0062±0,0004	0,0068±0,0004	0,0066±0,0004	0,0069±0,0003	0,0062±0,0003
	Direito					
	Rim	0,0066±0,0002	0,0065±0,0003	0,0074±0,0006	0,0072±0,0005	0,0068±0,0004
	Esquerdo					
	Baço	0,0037±0,0004	0,0043±0,0005	0,0117±0,0048	0,0040±0,0001	0,0034±0,0003
	Fígado	0,0465±0,0041	0,0472±0,0033	0,0560±0,0021	0,0460±0,0016	0,0450±0,0020

4.5. Avaliação macroscópica da pele

Após a 1ª semana de tratamento observaram-se alterações seborreicas nos murganhos do grupo III (DMBA+TPA), caracterizada pela presença de descamação nos locais submetidos ao tratamento tópico. Neste grupo foi observado o aparecimento de proliferações papilomatosas nos mesmos locais na 5ª semana após o início da aplicação destes agentes (Fig. 6). No final do ensaio, o conjunto dos animais deste grupo desenvolveu 94 proliferações cutâneas.

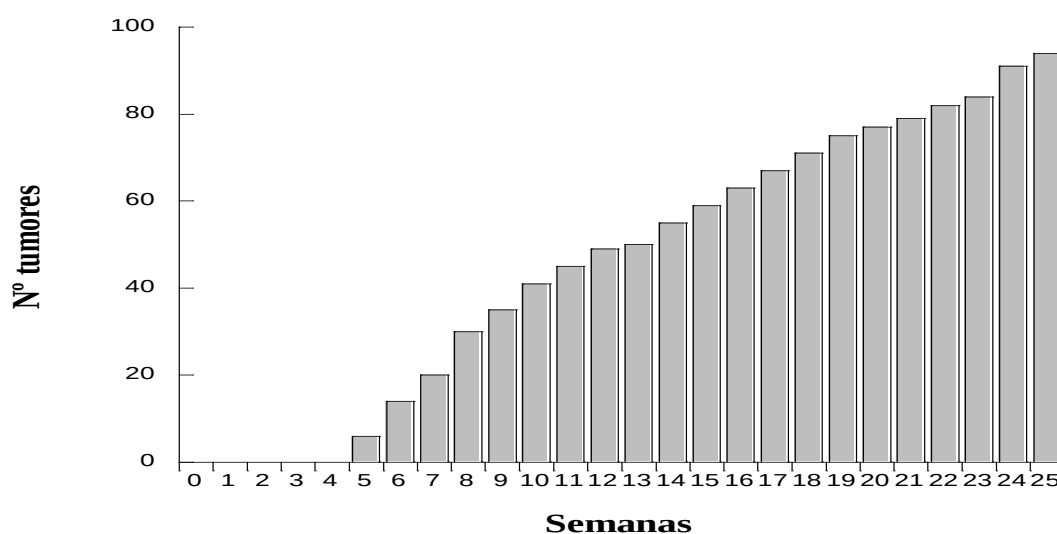


Fig. 6- Representação gráfica do número de proliferações observados ao longo do ensaio experimental, no grupo III (DMBA+TPA).

No Quadro 4 encontra-se discriminado o número de lesões papilomatosas observadas no Grupo III (DMBA+TPA) por animal, nas semanas 12, 18 e 24.

Quadro 4- Número de lesões cutâneas observadas nas semanas 12, 18 e 24 por murgancho, no Grupo III (DMBA+TPA).

Identificação do animal	Semana		
	12	18	24
Murgancho 1	16	19	22
Murgancho 2	10	19	26
Murgancho 3	7	9	13
Murgancho 4	12	20	27
Murgancho 5	0	0	0
Murgancho 6	4	5	6

Nas Figuras 7 e 8, podem observar-se as lesões existentes no murganho 4 do grupo III (DMBA+TPA) na 12^a e 25^a semana, respetivamente.



Fig. 7- Lesões macroscópicas observadas no murganho 4 do grupo III (DMBA+TPA) na 12^o semana do procedimento experimental.



Fig. 8- Lesões macroscópicas observadas no murganho 4 do grupo III (DMBA+TPA) na 25^o semana do procedimento experimental, 5 dias antes do sacrifício.

4.6. Avaliação por microscopia de luz

A nível histológico, a pele dos murganhos do grupo V (acetona) não exibiu alterações (Fig. 9A e B). Todos os animais do grupo I (DMBA) apresentaram presença de infiltrado inflamatório mononuclear escasso ao nível da derme superficial, de padrão predominantemente difuso (n=5; 100%) (Fig. 9C e D). Todos os animais do grupo IV (IPL) exibiram fibrose dérmica moderada (n=6; 100%), evidenciada com a coloração histoquímica Tricrómio de Masson (TM) (Fig. 9E e F). Todos os murganhos do grupo II (DMBA+IPL) apresentaram infiltrado inflamatório na derme superficial escasso a moderado (n=6; 100%), quatro apresentaram fibrose dérmica (n=4; 66,7%) e em 3 murganhos foi observada hiperplasia focal da epiderme (n=3; 50%) (Fig. 9G e H).

Os murganhos pertencentes aos grupos I, II, IV e V não desenvolveram neoplasias cutâneas; no grupo III (DMBA+TPA), 5 dos 6 animais (83,3%) desenvolveram formações exofíticas de morfologia papilar, num total de 94 lesões neoplásicas (Quadros 5 e 6). A nível histológico, todos os animais deste grupo apresentaram hiperplasia moderada a marcada da epiderme (caracterizada pela presença de 4 ou mais camadas epidérmicas), associada à presença frequente de papilomas (n=87, 92,6%). Os papilomas caracterizaram-se pela proliferação exofítica das células epiteliais da epiderme, em redor de um eixo conjuntivo, sem evidência de invasão estromal. Os papilomas exibiram frequentemente focos de displasia (n=30, 34,5%), sendo estes classificados de papiloma grau 3. A maioria dos papilomas observados foram papilomas grau 2 (n=54, 62,1%), ocorrendo apenas 3 papilomas grau 1 (n=3; 3,4%) (Fig. 10).

Quadro 5- Lesões proliferativas observadas em microscopia de luz nos diferentes grupos

Lesões histológicas				
Grupo	Tratamento	Hiperplasia	Papiloma	Carcinoma de células escamosas
I	DMBA	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
II	DMBA+ IPL	3/6 (50%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
III	DMBA+ TPA	6/6 (100%)	5/6 (83,33%)	3/6 (50%)
IV	IPL	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
V	Acetona	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

DMBA- 7,12 dimetilbenzentraceno; IPL – Luz intensa pulsátil; TPA – acetato de tetradecanoiforbol

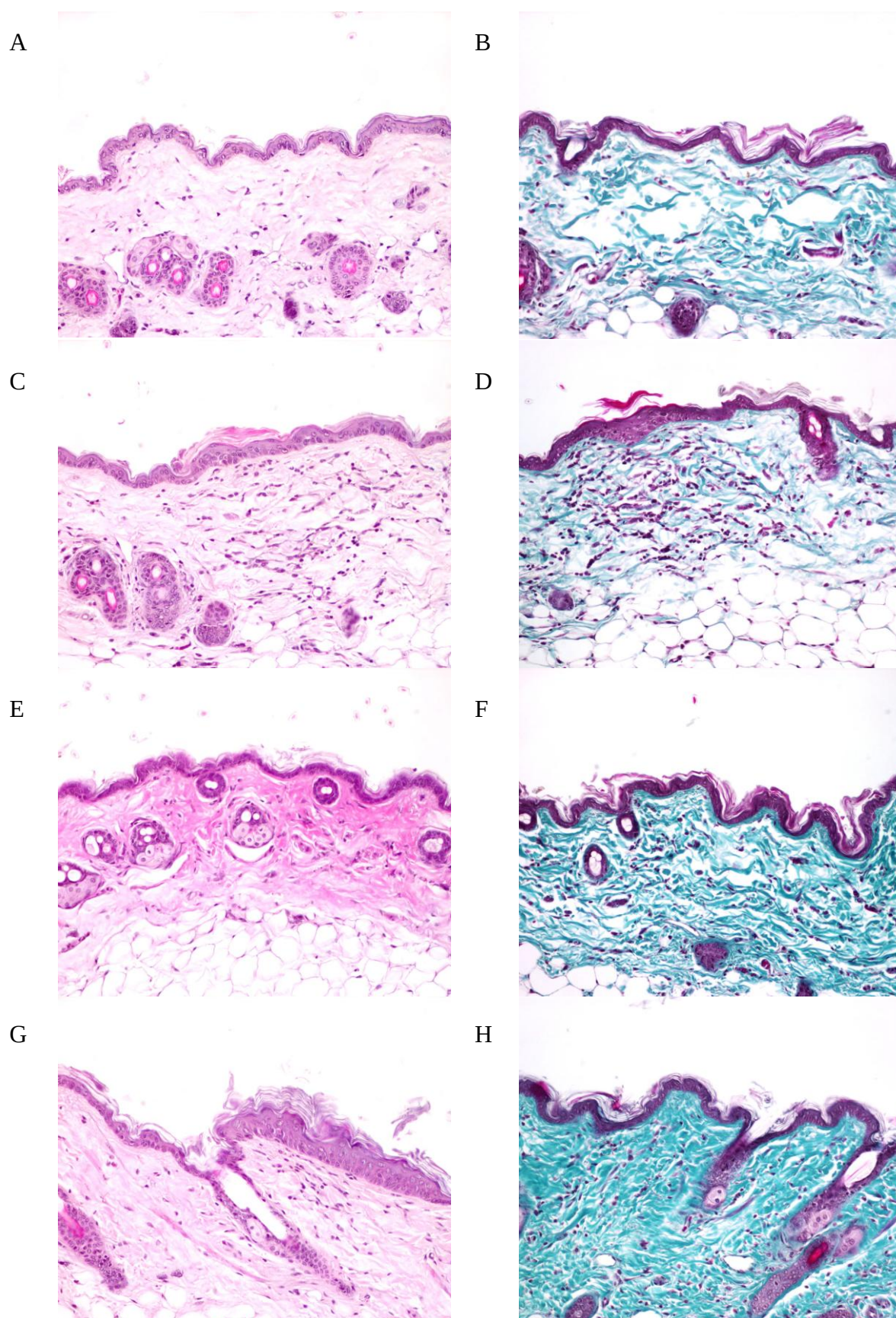


Fig. 9- Imagens histológicas da pele representativas dos vários tratamentos experimentais realizados: pele sem alterações (tratamento com acetona, A e B), dermatite mononuclear difusa (tratamento com DMBA, C e D); fibrose dérmica (tratamento com IPL, E e F); dermatite ligeira e fibrose (G e H), associada a hiperplasia da epiderme (G) (tratamento com DMBA+ IPL). HE (A, C, E e G), TM (B, D, F e H). Obj. 20x.

Raramente, foram diagnosticados carcinomas de células escamosas (CCE) (n=7, 7,4%) (Quadro 6). Estas neoplasias apresentaram uma morfologia predominantemente endofítica, sendo caracterizados por invasão estromal, evidenciada pela descontinuidade da membrana basal, estando associados à presença de infiltrado inflamatório moderado a marcado. Não foi observada invasão do *paniculus carnosus*, pelo que foram considerados como carcinomas microinvasores (Fig. 10).

Quadro 6- Lesões proliferativas cutâneas observadas no grupo III

Neoplasias			
Identificação do animal	Papiloma	Carcinoma de células escamosas	Total
Murganho 1	21	1	22
Murganho 2	21	5	26
Murganho 3	13	0	13
Murganho 4	26	1	27
Murganho 5	0	0	0
Murganho 6	6	0	6
Total	87	7	94

No que diz respeito aos restantes órgãos, o coração não apresentou alterações significativas, com a exceção de um murganho do grupo IV (IPL), que exibiu uma miocardite/pericardite crónica. Quanto ao pulmão, os murganhos dos grupos I (DMBA) e V (acetona) não tinham alterações, verificando-se a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear intersticial em 5/6 (83,3%) murganhos do grupo III (DMBA+TPA) e em dois murganhos (33,3%) dos grupos II (DMBA+IPL) e IV (IPL). Com a exceção de um murganho do grupo I (DMBA), todos os animais incluídos no estudo exibiram a presença de infiltrado inflamatório mononuclear intersticial escasso a moderado ao nível do rim. Relativamente ao fígado, à exceção de um murganho dos grupos IV (IPL) e V (acetona), todos apresentaram degenerescência vacuolar hepatocitária ligeira a moderada. Dois animais do grupo III (DMBA+TPA) também exibiram a presença de infiltrado inflamatório mononuclear periportal escasso. Foi observada hiperplasia linfóide esplénica num murganho do grupo I (DMBA), II (DMBA+IPL) e IV (IPL) e em três murganhos do grupo III (DMBA+TPA), num dos quais evidenciada macroscopicamente por esplenomegalia. No Grupo V (acetona) não foram observadas alterações.

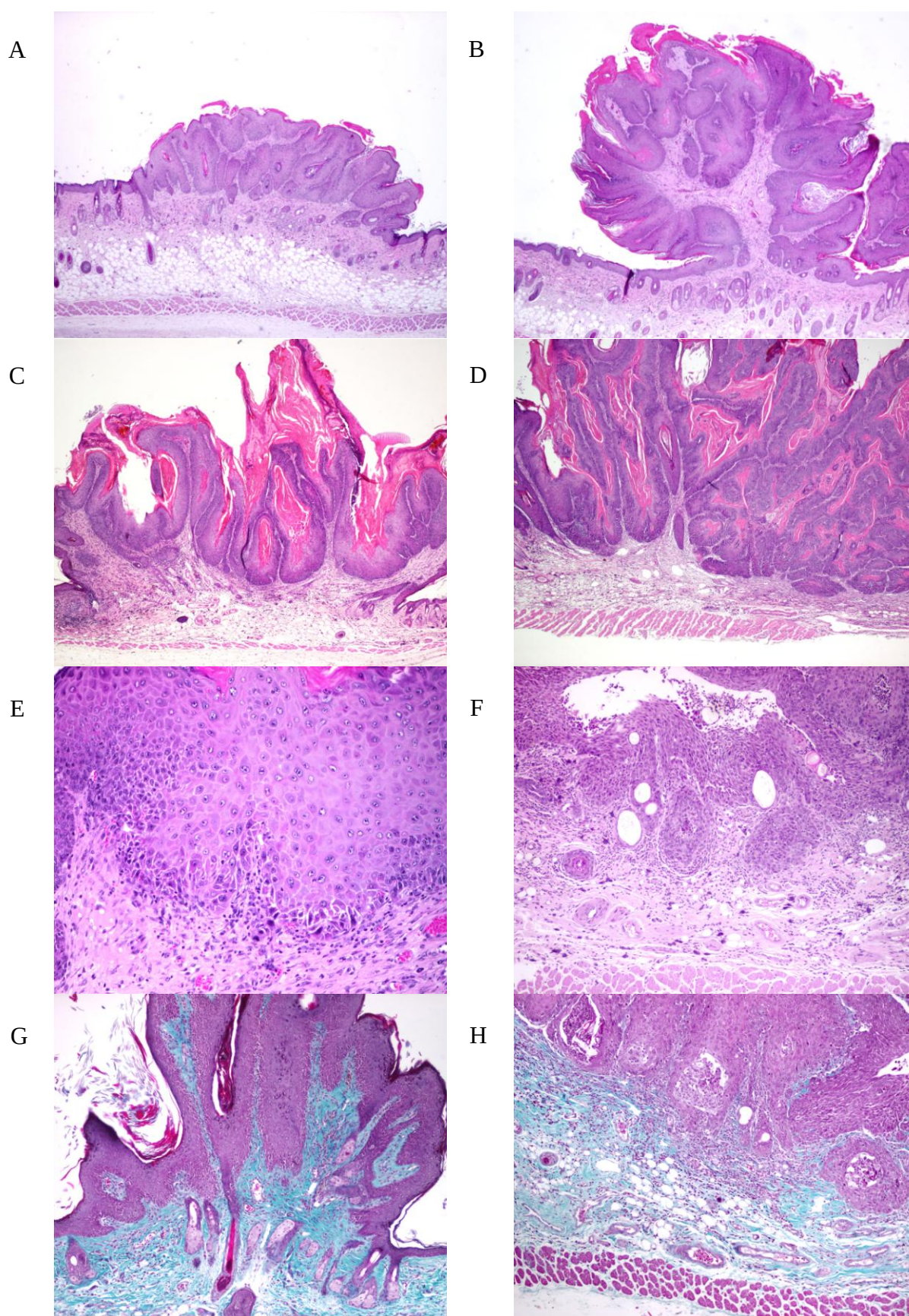


Fig. 10- Imagens histológicas da pele representativas de lesões proliferativas após tratamento com DMBA/TPA: papiloma grau 1 (A), grau 2 (B) e grau 3 (C); CCE microinvasor (D-F); fibrose marcada do estroma adjacente a um papiloma (G) e a um CCE. HE (A-F); TM (G e H). Obj. 4x (A-D); 10x (F-H); 20x (E).

5. DISCUSSÃO

O primeiro dispositivo IPL foi criado em 1985; contudo, só em 1994 é que foram lançados como dispositivos para utilização médica (Stangl *et al.*, 2008). Estes dispositivos permitem ajudar no fotorrejuvenescimento, eliminação de acne, correção de alterações vasculares e pigmentação, eliminação das tatuagens e remoção do pelo (Town e Ash, 2010; Goldberg, 2012), razão pela qual têm sido desenvolvidos aparelhos cada vez mais fáceis de manusear e com um aumento de segurança para utilização doméstica (Chan *et al.*, 2007; Babilas *et al.*, 2010). É muito importante ter em consideração alguns parâmetros como o tipo e estado da pele para uma escolha adequada do comprimento de onda a utilizar, para que não ocorram danos indesejados (Babilas *et al.*, 2010). Existem vários modelos destes aparelhos, subdivididos em modelos para utilização profissional e modelos para utilização doméstica.

Apesar de existirem alguns estudos realizados no sentido de prever os efeitos secundários associados à utilização destes dispositivos (Chan *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Goldberg, 2012), até ao momento, os trabalhos experimentais existentes são escassos, estando sobretudo direcionados para dispositivos de fotorrejuvenescimento ou eliminação de manchas de pele, pois o recurso a estes dispositivos tem aumentado e não existem evidências de quais as suas consequências a longo prazo (Chan *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2009).

É fundamental recorrer à experimentação animal para executar este tipo de estudos, pois caso contrário poderiam passar décadas sem se determinar se a longo prazo o uso crónico destes aparelhos será ou não prejudicial para o Homem (Chan *et al.*, 2007). Goldberg (2012), executou um estudo a nível histológico que provou que ocorre remodelação dérmica após aplicação destes dispositivos, associada à síntese do colagénio. É de salientar que a pele humana pode ser rejuvenescida, não só devido ao processo de síntese de novo colagénio, mas também devido ao aumento da sua degradação (Luo *et al.*, 2009). Isto é, o aquecimento provocado pela IPL na pele leva em primeiro lugar à degradação do colagénio existente, promovendo, subsequentemente, a formação de novo colagénio como processo de cicatrização (Chan *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que a energia libertada pelo dispositivo IPL poderá estimular diretamente os fibroblastos (Patriota *et al.*, 2011).

Chan e seus colaboradores realizaram em 2007 um estudo com murganhos ICR comparando diferentes dispositivos de laser com o dispositivo IPL (Estelux, com comprimentos de onda entre 500-670nm e 870-1400nm, fluência de 30J/cm²) para observar se estes iriam induzir sinais de toxicidade ou lesões dermatológicas. Esse estudo teve a duração

de cerca de 6 meses, com aplicações de luz 2 vezes por semana. No final do procedimento experimental, verificaram que os animais não manifestavam sinais de toxicidade; contudo, observaram que o grupo sujeito a IPL, apesar de não demonstrar evidências macroscópicas de desenvolvimento de tumores ou lesões cutâneas, exibiam níveis mais elevados de p16, um indicador da ocorrência de danos no ADN, levantando a hipótese de que a longo prazo se poderiam vir a desenvolver tumores. Este estudo investigou os efeitos do tratamento com dispositivos IPL durante 6 meses (cerca de 25% da vida de um murganho, que normalmente tem um tempo médio de vida de 2 anos); contudo, será importante fazer outros estudos mais longos, nomeadamente em murganhos com alterações específicas no *locus* p16 e outros, para garantir a segurança do uso destes dispositivos a curto e longo prazo (Chan *et al.*, 2007).

Um estudo efetuado por Patriota e seus colaboradores em 2011, para testar a eficácia de um dispositivo IPL (Record 618, com comprimento de onda 420-1100nm e fluência 10-20J/cm²) em 26 mulheres com idade compreendida entre os 40-65 anos, demonstrou que ocorreram melhorias significativas ao nível do rejuvenescimento cutâneo. O estudo teve a duração de 6 meses, tendo as doentes sido submetidas a 5 sessões com intervalo mensal entre elas. No final, ao executarem-se as biopsias cutâneas, verificou-se que os níveis de fibras de colagénio e elásticas aumentaram em 51,33% e 44,13%, respetivamente. Não foi observada qualquer lesão que poderia pôr em risco a saúde humana com a utilização destes aparelhos; contudo, há que ter em consideração que este estudo não foi executado a longo prazo, não se podendo tirar conclusões de possíveis efeitos posteriores ocorridos ao longo da vida destas doentes (Patriota *et al.*, 2011).

Hedelund *et al.* (2006) utilizaram murganhos fêmeas C3H, sem pelo e pigmentados (n=144). O estudo consistiu em 3 tratamentos com IPL (Ellipse Flex, comprimento de onda 530-750nm e fluência 9J/cm²) com 2 semanas de intervalo e com radiação UV. Concluíram que o tratamento com IPL em fotorrejuvenescimento não tem potencial maligno por si só e não influencia a carcinogénese induzida pela radiação UV. No entanto, a radiação UV influencia a ocorrência de edemas e eritemas após o tratamento de fotorrejuvenescimento com IPL (Hedelund *et al.*, 2006).

O cancro tornou-se uma das principais causas de morte a nível mundial, sendo considerado um dos maiores problemas de Saúde Pública, sendo por isso muito importantes os estudos que investiguem o potencial cancerígeno destes dispositivos (Greaves e Maley, 2012; Siegel *et al.*, 2012). A incidência de cancro de pele a nível mundial tem aumentado consideravelmente, atingindo principalmente as pessoas de pele clara. A radiação ultravioleta é considerada como a principal causa para o desenvolvimento desta doença (Tuohimaa *et al.*, 2007). Ao realizar este procedimento experimental, foi nosso objetivo verificar a influência da

luz pulsátil ao nível da pele, utilizando-se um modelo animal experimental de dois estadios ou etapas de cancro da pele.

A indução de cancro da pele em murganhos, para estudos experimentais pode ser efetuada através de dois métodos: o modelo de carcinogénese completa e o modelo de dois estadios (Manenti *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2009). O modelo de carcinogénese completa resulta da aplicação de uma única dose elevada de um agente carcinogénico ou luz UV, não sendo necessária a exposição a um agente promotor, pelo que se torna difícil relacionar os efeitos do agente com as etapas da carcinogénese (Abel *et al.*, 2009). Por sua vez, no modelo de dois estadios recorre-se à utilização de dois compostos, um iniciador e um promotor. É mais comum a utilização do modelo de carcinogénese de dois estadios, uma vez que é mais vantajoso devido à sua elevada reprodutibilidade, simplicidade e versatilidade (Abel *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2010).

No modelo de dois estadios para indução de cancro de pele em murganhos, recorre-se normalmente aos compostos químicos DMBA e TPA (Manenti *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2009; Chaudhary *et al.*, 2009). O agente indutor, DMBA, provoca uma alteração da ativação oncogénica do gene *H-ras* em células epiteliais da pele, apenas com uma aplicação a baixa concentração. Contudo, são as alterações bioquímicas celulares, provocadas pela aplicação repetida do promotor, TPA, que promovem a expansão da mutação ocorrida, da qual resulta o desenvolvimento de lesões papilomatosas, que podem ou não progredir para carcinoma (DiGiovanni, 1991; Chun *et al.*, 2004; Bicker e Athar, 2006; Ishikawa *et al.*, 2010). Existem estudos que revelam que a aplicação de TPA promove alterações não só a nível bioquímico como histológico. Normalmente ocorre indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que está associada à inflamação e proliferação celular, assim como ao aumento das espécies reactivas de oxigénio (ERO), responsáveis pela oxidação de quase todas as biomoléculas, entre as quais lípidos, ADN, ARN e proteínas, o que contribuirá para o desenvolvimento de cancro (Bicker e Athar, 2006; Chaudhary *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foi testado um dispositivo IPL de uso doméstico (Philips Lumea®) durante 20 semanas, em murganhos fêmeas albinos ICR (CD-1®), de forma a compreender a influência deste tipo de luz num modelo animal de dois estadios de cancro da pele a nível histológico e observar se poderiam vir a desenvolver lesões pré-neoplásicas. Os 28 animais foram divididos em 5 grupos: os murganhos do grupo I foram sujeitos a uma administração única de DMBA no início da experiência; no grupo II administrou-se uma dose de DMBA no início do protocolo e aplicou-se luz pulsátil 2 vezes por semana durante 20 semanas de forma a testar se este tipo de dispositivo funcionava como promotor de cancro em células previamente sujeitas à ação do iniciador químico (DMBA); no grupo III procedeu-se da

mesma forma que no grupo anterior, substituindo-se a luz pelo conhecido promotor de cancro da pele, o TPA, de forma a comparar a ação do dispositivo IPL e o composto químico TPA; o grupo IV foi sujeito exclusivamente a luz pulsátil, duas vezes por semana para observar se este induzia lesões cutâneas quando aplicado em células consideradas normais; por último o grupo V correspondeu ao controlo, sendo aplicado o veículo (acetona) 2 vezes por semana, para verificar se o veículo utilizado teria qualquer efeito na pele dos animais. É importante referenciar que todos os animais foram previamente depilados na mesma zona a testar (zona dorsal), de forma a respeitar as instruções da utilização do dispositivo IPL e de manter a uniformidade dos parâmetros a comparar, nomeadamente a zona dermatológica.

No final do procedimento observou-se que relativamente ao IHP, os grupos I (DMBA), II (DMBA + IPL) e IV (IPL) apresentaram maior variação ($IHP \geq 0,90$), enquanto que os grupos III (DMBA + TPA) e V (acetona) apresentaram uma menor variação ($IHP = 0,80$). Em relação ao GP, o grupo V (acetona) apresentou $28,09 \pm 4,18g$, sendo o grupo com maior percentagem de GP. Já o grupo III (DMBA+TPA) apresentou o menor GP, $6,85 \pm 5,52g$. A diferença entre estes dois grupos foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Um estudo efetuado por Kaur e seus colaboradores, em 2010, em que sujeitaram murganhos fêmeas ICR a um processo de carcinogénese química de modelo de dois estadios (DMBA e TPA) durante 24 semanas demonstrou que o grupo sujeito a tratamento de DMBA e TPA também apresentou pesos inferiores aos do grupo controlo, tal como verificámos neste trabalho. Estes autores associaram a perda de peso às alterações bioquímicas provocadas pelo processo de carcinogénese, nomeadamente devido ao aumento de ERO e a inflamação (Kaur *et al.*, 2010). Outros estudos anteriores, nomeadamente os efetuados por Chun (2004) e por Bicker (2006) também referem esta diferença de pesos (Chun *et al.*, 2004; Bicker e Athar, 2006).

O consumo de água e alimento manteve-se constante em todos os grupos, desde o início até ao final do procedimento experimental, com a exceção do grupo II (DMBA+IPL), que aumentou consideravelmente o consumo de água. Não existem estudos anteriores que ponham em consideração a quantidade de água consumida pelos animais, pelo que não existe nenhuma explicação concreta para tal facto ter ocorrido, no entanto pode-se considerar que poderá estar relacionado com as perdas de água durante o manuseamento dos biberões. Contudo, não se pode ter certeza disto, uma vez que se manusearam todas as gaiolas de igual forma e apenas uma (grupo II) demonstrou um aumento considerável no consumo de água.

O peso relativo e absoluto dos órgãos foi semelhante entre os diversos grupos. No entanto, no grupo III (DMBA+TPA), o baço apresentou valores superiores aos restantes grupos, apesar de não significativos. Sakai *et al.* (2004) induziram carcinomas na face de murganhos com DMBA durante 12 semanas e observaram que o grupo submetido ao DMBA

evidenciou um decréscimo significativo do peso corporal comparativamente ao grupo controlo. Por outro lado, observaram diferenças significativas no que diz respeito ao peso do baço, que aumentou substancialmente ao longo do procedimento experimental. Surpreendentemente, neste estudo, apesar de três grupos de murganhos terem sido expostos ao DMBA (I,II, e III), apenas o grupo III, no qual também foi aplicado o promotor TPA, exibiu um aumento significativo do peso deste órgão, comparativamente ao grupo controlo (V). Este facto sugere que a aplicação dos dois compostos poderá promover uma hiperplasia linfóide esplénica, a qual foi demonstrada em três murganhos (50%) do Grupo III, o que justifica o peso superior deste órgão verificado neste grupo. Outro estudo, utilizando o composto carcinogénico MNNG, demonstrou que o número de linfócitos no baço aumentava com o aumento do tamanho das neoplasias conduzindo, por vezes, a esplenomegalia (Matsumoto, 1994). A hiperplasia linfóide esplénica, portanto, pode resultar da reatividade das células imunocompetentes, associada ao crescimento e alastramento das lesões proliferativas da epiderme.

Em 2005, Steele e seus colaboradores verificaram que, com a utilização deste modelo de dois estadios (DMBA+TPA) em murganhos CD-1 durante 20 semanas, o aparecimento dos primeiros papilomas ocorreu 6 semanas após o início da aplicação do promotor, observando-se o aparecimento dos carcinomas de células escamosas apenas cerca de 18 semanas depois (Steele *et al.*, 2005). O presente trabalho experimental vem comprovar estas evidências, visto que as primeiras proliferações papilomatosas se identificaram, macroscopicamente, à 5ª semana, aumentando consideravelmente o seu número ao longo do período experimental, sendo que no final do protocolo se observaram 94 proliferações cutâneas, das quais apenas 7 foram classificadas como carcinomas de células escamosas.

Neste estudo, o crescimento das lesões neoplásicas nos murganhos não foi homogénea. Os murganhos 1, 2 e 4 apresentaram um número de tumores superior a 10 na 12ª semana, aumentando este número progressivamente até ao final do protocolo. Por sua vez, os murganhos 3 e 6 apresentaram um número de lesões mais reduzido, chegando à 24ª semana com um número de tumores inferior a 13. Esta incoerência de resultados pode ter ocorrido devido ao facto das alterações metabólicas provocadas pelo DMBA/TPA não ocorrerem de igual forma nem ao mesmo tempo para todos os animais (Chun *et al.*, 2004; Bicker e Athar, 2006). O estudo de Chaudhary *et al.* (2009), efetuado para observar a influência de diferentes concentrações de farnesol em murganhos albinos submetidos a um processo de carcinogénese química com DMBA e TPA, demonstrou que normalmente se encontra o dobro dos tumores contabilizados a meio do procedimento (entre as 10 e 12 semanas). No presente trabalho verifica-se o mesmo, ou seja, na 12ª semana a maioria dos murganhos tinha metade do

número de papilomas existentes no final do protocolo experimental, com exceção dos murganhos 1 e 6. Um dos murganhos (murganho 5) não apresentou qualquer tipo de lesão cutânea proliferativa, pelo que se pode considerar que provavelmente ocorreu algum problema na administração da dose do iniciador, DMBA. Estudos anteriores demonstram que a administração do promotor não tem efeito cancerígeno *per se*, se não existir uma célula iniciada com mutação (Poland *et al.*, 1982; Abel *et al.*, 2009; Chaudhary *et al.*, 2009). Resumindo, no caso de ser administrada a mesma dose de TPA num murganho, mas sem antes este ter sido sujeito a uma administração de DMBA, o animal não irá desenvolver uma lesão neoplásica, uma vez que não há células iniciadas, com danos no ADN, pronta a ser sujeita a mutação e iniciar-se a fase da promoção. Uma explicação para o facto de existir um murganho sem qualquer tipo de lesão tumoral e outros com números de lesões diferentes entre si poderá ser uma deficiente homogeneização do produto ou uma administração do produto em quantidade insuficiente.

Neste trabalho, durante a análise histológica comprovou-se a inexistência de lesões neoplásicas nos grupos I (DMBA), II (DMBA+IPL), IV (IPL) e V (acetona). Verificou-se que o grupo V (acetona) não tinha evidências de qualquer lesão ou alteração. Por outro lado, os grupos I (DMBA) e II (DMBA+IPL) demonstraram a presença de um infiltrado inflamatório ao nível da derme, escasso no primeiro caso e escasso a moderado no segundo, sugerindo que a aplicação da IPL poderá agravar a inflamação provocada pelo DMBA. Na análise ao grupo IV (IPL) verificou-se a existência de fibrose dérmica moderada, o que comprova que a IPL pode ser eficaz no fotorrejuvenescimento e na redução das rugas, tal como verificado recentemente na pele dos ratos, utilizando um dispositivo IPL, na fluência 30 J/cm^2 , tendo estes autores concluído que a IPL aumenta o número de fibras de colagénio na derme, bem como o seu diâmetro (Cho *et al.*, 2012). A técnica de coloração histoquímica Tricrómio de Masson, é uma das mais utilizadas em histologia (Masson, 1929), podendo este método ser utilizado para várias finalidades, nomeadamente para identificar músculo e colagénio de tecido normal ou neoplásico (Jones, 2010). No nosso trabalho, revelou-se útil na demonstração da fibrose dérmica, devida ao aumento do número de fibras de colagénio.

No grupo II, foi também observada fibrose dérmica (n=4; 66,7%) e hiperplasia focal da epiderme (n=3; 50%). Sabe-se que a hiperplasia pode ter um papel importante na inflamação e promoção neoplásica, pelo que o facto de se observarem estas lesões no grupo II (DMBA+IPL) poderá indicar o desenvolvimento de neoplasias a longo prazo (Chaudhary *et al.*, 2009). Relativamente ao grupo III (DMBA+TPA), é possível observar três tipos de lesões proliferativas da epiderme: hiperplasia, papiloma e carcinoma de células escamosas. A hiperplasia é uma lesão provocada na pele do murganho devido à ação inflamatória do

composto carcinogénico. Normalmente, este tipo de lesão ocorre devido a uma alteração bioquímica e/ou metabólica na COX-2 ou devido à geração de ERO (Chaudhary *et al.*, 2009). Um estudo efetuado em 1980, por Argyris, demonstrou que mesmo sendo administrado apenas o iniciador, DMBA, verificava-se que os murganhos desenvolviam esta lesão (Argyris, 1980). Os papilomas são lesões proliferativas benignas, podendo no entanto sofrer transformação maligna para carcinoma de células escamosas, o qual é considerado como o mais agressivo e letal dos câncros da pele não melanoma (Poland *et al.*, 1982; Ericson *et al.*, 2008; Maio, 2012). No nosso trabalho, esta transformação ocorreu em apenas sete neoplasias papilomatosas.

Observou-se que a IPL por si só não tem efeito cancerígeno, uma vez que o grupo IV não mostrou evidências histológicas de lesões possivelmente neoplásicas. No entanto, no caso de ser aplicada em lesões pré-neoplásicas, poderá estar associada ao desenvolvimento de lesões proliferativas a longo prazo. Deste modo, a IPL poderá funcionar como um agente promotor, assim como o TPA que, quando administrado sem aplicação prévia de um iniciador não produz efeitos cancerígenos, mas no caso de existir uma lesão pré-neoplásica aquando da sua aplicação, pode promover o desenvolvimento neoplásico (Poland *et al.*, 1982). Contudo, para comprovar esta hipótese, será necessário proceder a protocolos experimentais adicionais, nomeadamente efetuar um procedimento experimental mais longo, de forma a determinar se ocorre o desenvolvimento de neoplasias em animais submetidos a uma dose de DMBA e várias aplicações de IPL e observar o efeito da IPL na pele de animais submetidos à aplicação de DMBA e TPA.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho experimental, foi nosso objetivo estudar o efeito da aplicação da IPL a nível cutâneo, utilizando para tal um dispositivo comercial de uso doméstico. Os efeitos da aplicação da IPL foram avaliados num modelo animal, mais concretamente ao nível de pele normal e de pele previamente sujeita à ação de um agente carcinogénico iniciador. Foi utilizado um modelo animal de dois estadios de cancro de pele com a utilização de DMBA e TPA como agentes iniciador e promotor, respetivamente. Neste estudo, comprovámos que o único grupo que desenvolveu lesões proliferativas cutâneas foi o grupo em que ambos os agentes foram aplicados (grupo III, tratamento com DMBA+TPA).

A avaliação histológica da pele dos murganhos após aplicação da IPL revelou a presença de fibrose dérmica moderada, com ou sem tratamento prévio do agente iniciador DMBA (grupos II (DMBA+IPL) e IV (IPL)). No primeiro caso, foi também observada hiperplasia focal da epiderme, sugerindo que o uso de dispositivos IPL a longo prazo pode promover o desenvolvimento de lesões neoplásicas em células “iniciadas”. A demonstração de fibrose nos murganhos expostos ao tratamento com IPL confirma estudos prévios acerca da potencialidade da IPL no fotorrejuvenescimento.

Consideramos fundamental a realização de estudos futuros mais prolongados para determinar o efeito real dos dispositivos IPL na pele, nomeadamente recorrendo a dispositivos IPL com fluxos de energia superior ao utilizado neste trabalho experimental. Outro estudo promissor é o estudo da influência da IPL na pele sujeita à ação prévia de DMBA+TPA, assim como avaliar a IPL como um potencial agente iniciador, aplicando em seguida um agente promotor (TPA).

7. BIBLIOGRAFIA

- Abel, E.; Angel, J.; Kiguchi, K. e DiGiovanni, J.. “Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications.” *Nature Protocol* (2009) 9: 1350-1362.
- Argyris, T. “Tumor promotion by abrasion induced epidermal hyperplasia in the skin of mice.” *Journal of Investigative Dermatology* (1980) 75: 360-362.
- Babilas, P.; Schreml, S.; Szeimies, R. e Landthaler, M. “Intense pulsed light (IPL): a review.” *Lasers in Surgery and Medicine* (2010) 42: 93-104.
- Beremblum, I. e Shubik, P. “The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction of the mouse’s skin.” *British Journal of Cancer* (1947) 1: 379-382.
- Bertram, J. “The molecular biology of cancer.” *Molecular Aspects of medicine* (2001) 21: 167-223.
- Bicker, D. e Athar, M. “Oxidative stress in the pathologies of skin disease.” *Journal of Investigate Dermatology* (2006) 126: 2565-2575.
- Boyle, P.; Dore, J.; Autier, P. e Ringborg, U. “Cancer of the skin: a forgotten problem in Europe.” *Annals of Oncology* (2004) 15: 5-6.
- Butterworth, B.; Popp, J.; Conolly, R. e Goldsworthy, T. “Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis.” *IARC Scientific Publications* (1992) 116: 279-305.
- Chan, H.; Yang, C.H.; Leung, J. e Wei, W.I. “An animal study of the effects on p16 and PCNA of repeated treatment with high-energy laser and intense pulsed light exposure.” *Lasers in Medical Science* (2007) 39: 8-13.
- Chan, Henry; Yong, C.; Leung, Joseph; Wei, W. e Lai, K. “An animal study of the effects on p16 and PCNA expression of repeated treatment with High-Energy laser and intense pulsed light exposure.” *Lasers in Surgery and Medicine* (2007) 39: 8-13.
- Chaudhary, S.; Alam, Mohammad; Siddiqui, M. e Athar, M. “Chemopreventive effect of farnesol on DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis: Involvement of inflammation, Ras-ERK pathway and apoptosis.” *Life Sciences* (2009) 85: 196-205.
- Cho, EB.; Park, H.; Park, EJ.; Kwon, IH.; Kim, SS.; Kim, KH.; Kim, KJ. e Park, HR. “Effects of intense pulsed light on rat skin” *Dermatologic Surgery* (2012) 38: 430-436.

- Chun, K.; Kim, S.; Song, Y. e Surch, Y. "Celecoxila inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of AP-1 and p38 MAP kinase in mouse skin." *Carcinogenesis* (2004) 25: 713-722.
- Cohen, S. "Analysis of modifying factors in chemical carcinogenesis." *Progress in Experimental Tumor Research* (1991) 33: 21-40.
- Cohen, S.; Arnold, L. "Chemical carcinogenesis." *Toxicological Sciences* (2011) 120: 76-92.
- Colditz, G. "Cancer prevention: The causes and prevention of cancer." Kluwer Academic Publishers (2001) 1: 161-172.
- Dhawan, D.; Balasubramanian, S.; Amonkar, A. e Singh, N. "Chermopreventive effect of 4'-demethyl epipodophyllotoxin on DMBA/TPA-induced mouse skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* (1999) 6: 997-1003.
- DiGiovanni, J. "Modification of multistage skin carcinogenesis in mice." *Progress in Experimental Tumor Research* (1991) 33: 192-229.
- Dixon, K. e Kopras, E. "Genetic alterations and ADN repair in human carcinogenesis." *Seminars in Cancer Biology* (2004) 14: 441-448.
- Ericson, M.; Wennberg, A. e Larko, O. "Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma." *Therapeutics and Clinical Risk Management* (2008) 1: 1-9.
- Farmer, P. "Carcinogen adducts: use in diagnosis and risk assessment." *Clinical Chemistry* (1994) 40: 1438-1443.
- Foulds, L. "The experimental study of tumor progression: a review." *Cancer Research* (1954) 14: 327-339.
- Gerstenblith, M.; Shi, J. e Landi, M. "Genome-wide association studies of pigmentation and skin cancer: a review and meta-analysis." *Pigment Cell Melanoma Research* (2012) 23: 587-606.
- Goldberg, D. "Current trends in intense pulsed light." *Clinical Aesthetic* (2012) 6: 45-53.
- Goldsworthy, T.; Butterworth, B. e Maronpot, R. "Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis." *Environmental Health Perspectives* (1993) 101: 59-66.
- Gonzalez, F..a) "The use of gene knockout mice to unravel mechanisms of toxicity and chemical carcinogenesis." *Toxicology Letters* (2001) 120: 199-208.

- Gonzalez, F.; e Kimura, S..b) "Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice." *Mutation Research* (2001) 477: 79-87.
- Grant, W. "Role of solar UVB irradiance and smoking in cancer inferred from cancer incidence rates by occupation in Nordic countries." *Dermato-Endocrinology* (2012) 4: 203-211.
- Greaves, M. e Maley, C. "Clonal evolution in cancer." *Nature* (2012) 481: 306-313.
- Gu, M.; Dhanalakshmi, S. e Singh, R. "Dietary feeding of silibinin prevents early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1. Hairless mouse epidermis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* (2005) 14: 1344-1349.
- Guengerich, F. "Metabolism of chemical carcinogens." *Carcinogenesis* (2000) 3: 345-351.
- Gutierrez, J.; Salsamendi A. "Carcinogenesis química. In: Fundamentos de Ciencia Toxicológica." Diaz de Santos, (2001) 1: 155-177.
- Harlan: www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/icr_cd1_outbred_mice.hl (1 de Agosto de 2012, Quarta-feira)
- Hedelund, L.; Lerche, C.; Wulf, H.C. e Haedersdal, M. "Carcinogenesis related to intense pulsed light and UV exposure: an experimental animal study." *Lasers in Medical Science* (2006) 21: 198-201.
- Homburger, F. "Chemical carcinogenesis in the Syrian golden hamster." *Cancer* (1969) 2: 313-338.
- Hong, H.; Sun, J. e Cal, W. "Anatomical and molecular imaging of skin cancer." *Clinical, Cosmetic and Investigation Dermatology* (2008) 1: 1-17.
- Hursting, S.; Slaga, T.; Fischer, S.; DiGiovanni, J. e Phang, J. "Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice." *Journal of the National Cancer Institute* (1999) 91: p.215-225.
- Ishikawa, T.; Kumar, I.; Machado, H.; Wong, K.; Kusewitt, D.; Huang, S.; Fisher, S. e Herschman, H. "Positron emission tomography imaging of DMBA/TPA mouse skin multi-step tumorigenesis." *Molecular Oncology* (2010) 4: 119-225.
- Jiang, W. e Mansel, R. "Cancer metastasis, molecular and cellular mechanisms and clinical intervention." Kluwer Academic Publishers (2004) 1: 1-54..
- Jones, M. "Mastering the trichrome stain." *Special Stains and H&E* (2010) 14: 79-84.
- Kanojia, D. e Vaidya, M. "4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis." *Oral Oncology* (2006) 42: 1-13.

- Kaur, J.; Sharma, M.; Sharma, P. e Bonsal, M. "Antitumor activity of Lantadeneis in DMBA/TPA induced skin tumors in mice: expression of transcription factors." *American Journal of Biomedical Sciences* (2010) 2: 79-90.
- Kemp, C. "Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells." *Seminars in Cancer Biology* (2005) 15: 460-473.
- Kim, S.; Lee, J.; Kwon, H.; Ahn, B. e Lee, A. "Greater collagen deposition with the microneedle therapy system than with intense pulsed light." *American Society for Dermatologic Surgery* (2011) 37: 336-341.
- Klauning, J.; Kamendulis, L. e Xu, Y. "Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis." *Human and Experimental Toxicology* (2000) 19: 543-555.
- Lieber, C.; Majumder, S.; Ellis, D.; Billheimer, D. e Mahadevan-Jansen, D. "In vivo non-melanoma skin cancer diagnosis using raman microspectroscopy." *Lasers Surgery Medical* (2009) 40: 461-467.
- Loeb, L. e Harris, C. "Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective." *Cancer Research* (2008) 68: 6863-6872.
- Lu, J.; Yu, X.; Kang, J.; Ouyang, Z.; Geng, X.; Xiang, Y. e Huang, J. "Influence of intense pulsed light on the secretion of TGF- β 1 in cultured human fibroblasts and intervention of JNK inhibitor." *Journal of Central South University* (2010) 35: 419-423.
- Luo, D.; Cao, Y.; Wu, D.; Xu, Y.; Chen, B. e Xue, Z. "Impact of intense pulsed light irradiation em BALB/c mouse skin- in vivo study on collagens, matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor." *Laser Medicine Science* (2009) 24: 101-108.
- Lynch, D.; Svoboda, J.; Putta, S.; Hofland, H.; Chern, W. e Hansen, L. "Mouse skin models for carcinogenic hazard identification: utilities end challenges." *Toxicologic Pathology* (2007) 35: 853-864.
- Maio, M. "Melanoma as a model tumour for immune-oncology." *Annals of Oncology* (2012) 23: 10-14.
- Manenti, G.; Galbati, F.; Noci, S. e Dragani, T. "Outbred CD-1 mice carry the susceptibility allele at the pulmonar adenoma susceptibility 1|(Pas1) locus." *Carcinogenesis* (2003) 6: 1143-1148.
- Maronpot, R. "A symposium summary and perspective on comparative molecular biology of cancer." *Toxicology and Pathology* (1996) 24: 801-814.
- Masson, P. "Some histological methods. Trichrome staining and their preliminary technique." *Bulletin of the International Association of Medicine* (1929) 12: 75.

- Matsumoto, K. "Changes in immunological function of spleen in rats implanted with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric cancer." *The Japanese Journal of Surgery* (1994) 95: 448-457.
- McGillis, T. e Fein, H. "Topical treatment strategies for non-melanoma skin cancer and precursor lesions." *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* (2004) 23: 174-183.
- Melnick, R.; Kohn, M. e Portier, C. "Implications for risks assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis." *Environmental Health Perspectives* (1996) 104: 123-134.
- Merletti, F.; Galassi, C. e Spadea, T. "The socioeconomic determinants of cancer." *Environmental Health* (2011) 10: 1-7.
- Moreno-Arias, G.; Castelo-Branco, C. e Ferrando, J. "Side-effects after IPL photodepilation." *American Society for Dermatologic Surgery* (2002) 28: 1131-1134.
- Oliveira, Paula. "Cancerização experimental do urotélio do rato." Tese-Doutoramento (2006) Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.
- Park, K.; Kitteringham, N.; Maggs, J.; Pirmohamed, M. e Williams, D. "The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2005) 45: 177-202.
- Patriota, R.; Rodrigues, C. e Cucé, L.. "Luz intensa pulsada no fotoenvelhecimento: avaliação clínica, histopatológica e imuno-histoquímica." *Anais Brasileiros de Dermatologia* (2011) 86: 1129-1133.
- Poland, A.; Palen, D. e Glover, E. "Tumor promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice." *Nature* (1982) 300: 271-273.
- Raymundo, M. e Goldim, J. "Ética da pesquisa em modelos animais" *Bioética* (2002) 1 (10): 31-44.
- Ruiz, S.; Santos, M. e Paramio, J. "Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis?" *Cell Cycle* (2006) 5: 625-629.
- Sachiva, S. "Fitzpatrick skin typing: applications in dermatology." *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* (2009) 75: p. 93-96.
- Sakai, Y.; Tamaka, M.; Shirakawa, M. "Lymphocyte changes in peripheral blood, spleen, and liver in DMBA-induced squamous cell carcinoma of mouse cheek skin." *Odontology* (2004) 92: 36-42.
- Sand, M.; Sand, D.; Thrandorf, C.; Paech, V.; Altmeyer, P. e Bechara, F. "Cutaneous lesions of the nose." *Head and Face Medicine* (2010) 6: 1-16.

- Siegel, R.; Naishadham, D. e Jemal, A. "Cancer Statistics, 2012." *A Cancer Journal for Clinicians* (2012) 62: 10-29.
- Stangl, S.; Hadshiew, I. e Kimmig, W. "Side effects and complications using intense pulsed light (IPL) sources." *Medical laser application* (2008) 23: 15-20.
- Stanton, W.; Janda, M.; Baade, P. e Anderson, P. "Primary prevention of skin cancer: a review of sun protection in Australia and internationally." *Health Promotion International* (2004) 19: 369-378.
- Steele, V. e Lubet R. "The use of animal models for cancer chemoprevention drug development." *Seminars in Oncology* (2010) 37: 327-338.
- Steele, V.; Lubet, R. e Moon, R. "Preclinical animals models for the development of cancer chemoprevention drugs." *Cancer Chemoprevention* (2005): 39-46.
- Tanaka, T. "Chemopr vention of human cancer: biology and therapy." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (1997) 25: 139-174.
- Toth, B. "Species susceptibilities ti chemical carcinogens: a critical appraisal of the roles of genetic and viral agents." *In vivo* (2001) 15: p.467-478.
- Town, G. e Ash, C. "Are home-use intense pulsed light (IPL) devices safe?" *Lasers in Medical Science* (2010) 25: 773-780.
- Trosko, J. "Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm?" *Molecular Carcinogenesis* (2001) 30: p.131-137.
- Tuohimoa, P.; Pukkala, E.; Ghislaine, S.; Olsen, J.; Brewster, D.; Hemminki, K.; Tracey, E.; Weiderpass, E.; Kliewer, E.; Pompe-kim, V.; McBride, M.; Martos, C.; Chia, K.; Tonita, J.; Jonasson, J.; Boffetta, P. e Brennen, P. "Does solar exposure, as indicated by the non-melanoma skin cancers, protect from solid cancers: Vitamin D as a possible explanation." *European Journal of Cancers* (2004) 43: 1701-1712.
- Waddel, W. "Thresholds of carcinogenicity of flavors." *Toxicology Sciences* (2002) 68: 275-279.
- Weir, H.; Marret, L.; Cokkinides, V.; Barnholtz-Sloan, J.; Patel, P.; Tai, E.; Jemal, A.; Li, J.; Kim, J. e Ekwuema, D. "Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006." *Journal American Academic Dermatology* (2011) 65: 38-49.
- Wells, A. "Cell motility in cancer invasion and metastasis." *Springer* (2006) 1: pp.1-23..
- Williams, G. "Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment." *Toxicology* (2001) 166: p.3-10.

Wollina, U. "Non-melanoma skin cancer on the rise." *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* (2012) 5: 11-12.

Zoumpourlis, V.; Solakidi, S.; Papathoma, A. e Papaevangeliou, D. "Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* (2003) 7: 1159-1165.