

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA / ESTOMATOLOGIA**

VICTOR DE MELLO PALMA

**ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS COM IMIQUIMODE NA
QUIMIOPREVENÇÃO DA CARCINOGENESE BUCAL: INOVAÇÃO
PATENTÁRIA, ESTUDOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO* E *IN
VIVO***

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA / ESTOMATOLOGIA

VICTOR DE MELLO PALMA

**ABORDAGENS NANOTECNOLÓGICAS COM IMIQUIMODE NA
QUIMIOPREVENÇÃO DA CARCINOGENESE BUCAL: INOVAÇÃO
PATENTÁRIA, ESTUDOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA *IN VITRO* E *IN
VIVO***

Linha de pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica/Estomatologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Visioli

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luiza Abrahão Frank

Porto Alegre

2023

EPÍGRAFE

**“Aqueles que passam por nós, não vão
sós, não nos deixam sós. Deixam um
pouco de si, levam um pouco de nós.”**

(Antoine de Saint - Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Este momento de algum modo, é sempre saudosista. Até mesmo para doutorandos, diante das inúmeras dificuldades enfrentadas neste percurso. Muitas são as pessoas a agradecer pela contribuição em mais uma etapa da vida que se encerra, mas que também, se reinicia. Hoje finalizo o doutorado me sentindo mais forte e capaz de enfrentar novos desafios.

Aos meus pais, **Marine e Hilton**, assim como, a minha irmã **Bruna** minha eterna gratidão, pelo amor incondicional, oferecendo subsídios para meu crescimento profissional e pessoal. A presença de você mesmo que de longe significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a **Fernanda Visioli**, pessoa pela qual terei eterna gratidão e respeito, muito obrigado pela oportunidade de trabalhar contigo, por ter me direcionado em todos os pensamentos, por se mostrar uma excelente professora, pesquisadora, amiga, mãe e muito mais do que isso uma pessoa de índole inquestionável, tens toda a minha admiração.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a **Luiza Abrahão Frank** pelos ensinamentos durante minha caminhada, por cada sorriso alegre que acalma a alma de qualquer doutorando desesperado, pela ajuda em todos os trabalhos que eu realizei e por ser uma professora e amiga acessível e de conhecimento admirável.

Aos professores e colegas **Márcia de Oliveira Gaiger, Pantelis Varvaki Rados, Laura de Campos Hildebrand, Isadora Luana Flores, Vinícius Carrard, Marcelo Lamers, Manoela Domingues Martins e Marco Antonio Martins**. Muito obrigado por todos os ensinamentos, o profissional que sou hoje tem um pouco de cada um de vocês!

As professoras **Marcia Payeras, Cristiane Danesi e Kívia Ferrazzo**, que são exemplos e serviram como base na minha caminhada, minha eterna gratidão, se hoje aqui estou foi porque vocês despertaram esse amor a patologia/estomatologia.

Ao meu **grupo de pesquisa, NTnano**, principalmente a **Graziela Gomes, Andrey Morawski, Amanda Paiva e Vanessa Justo** pela ajuda incansável, suporte emocional e

incentivo, sem o esforço de vocês eu não chegaria em lugar nenhum. Minha eterna gratidão!

A todos os meus colegas e amigos, principalmente aos “**Visiólicos**” agradeço por cada incentivo e por todos os momentos felizes que vivemos juntos vocês são incríveis, ter amizade de vocês me faz mais feliz e com toda a certeza do mundo me fizeram permanecer aqui e concretizar esse sonho.

Aos meus amigos de fé **Paula Tassoni, Vagner Costa, Caroline Altes, Bruno Benevenuto e Gustavo Vieira** obrigado por todo o suporte emocional, por cada sopa quando eu estava doente, ou cada festa, vídeos chamadas e momentos de distração para me alegrar! Vocês são incríveis, tenho certeza que nossa amizade nunca vai se perder.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior CAPES pelo apoio financeiro durante meu estudo.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, por disponibilizar cursos gratuitos e de excelência, garantindo acesso universal ao conhecimento.

À **Faculdade de Odontologia – UFRGS**, e à disciplina de Patologia e Estomatologia pela recepção e oportunidade de ter sido professor substituto, e permitirem o meu desenvolvimento docente nesta universidade que é referência mundial.

A toda equipe do **Biotério do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA** pelo excelente auxílio e impecável condução dos pesquisadores durante o período experimental da minha tese.

Aos **animais utilizados neste estudo**, todo meu respeito.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e não foram citados, mas nem por isso esquecidos toda minha gratidão.

RESUMO

Esta tese está embasada na necessidade de novas abordagens quimiopreventivas para desordens potencialmente malignas (DPMs), com o objetivo de prevenir o câncer bucal, além de buscar melhorar a adesão dos pacientes aos tratamentos e sua qualidade de vida. Nesse contexto, foram elaboradas formulações nanotecnológicas destinadas a carrear o fármaco imiquimode especialmente delineadas para a mucosa bucal. Nesta tese, duas formulações foram empregadas: a primeira é inédita, constituindo-se como um biofilme nanotecnológico contendo imiquimode 5%, protegido por uma invenção patentária; a segunda é o hidrogel contendo imiquimode 0.05% nanoencapsulado, previamente desenvolvido e caracterizado, mas até então seu potencial quimiopreventivo não havia sido avaliado em um modelo *in vivo* de carcinogênese bucal. Ambas as formulações foram concebidas com o intuito de potencializar o efeito do fármaco imiquimode. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstram que os biofilmes possuem um potencial quimiopreventivo devido à combinação única de seus componentes. Os biofilmes com nanocápsulas apresentam uma maior mucoadesividade independente ou não da presença do imiquimode, tanto em disco de mucina ($p=0.004$) como em mucosa bucal suína fresca ($p=0.000$). As nanocápsulas também aumentaram a permeação do fármaco na formulação Fnc_imq em todos os tempos avaliados, em comparação com a formulação Fimq ($p=0.0002$). Além disso, o biofilme desenvolvido não demonstrou perfil irritante quando avaliados pela metodologia de HET-CAM. No estudo em cultura celular nenhuma citotoxicidade foi observada em células não tumorais, no entanto, o biofilme inovador foi citotóxico para SCC9. No estudo *in vivo*, a maioria dos animais, onde foi induzida a carcinogênese com 7,12-dimetilbenz [a]ntraceno (DMBA), tratados com essa formulação não apresentaram alterações clínicas e histopatológicas na mucosa bucal e na pele. O hidrogel contendo imiquimode 0.05% nanoencapsulado também demonstrou ser uma potencial abordagem quimiopreventiva nos estudos *in vivo*. A maioria dos animais não apresentou alteração clínica na mucosa bucal e na pele. Do ponto de vista histológico, 60% dos animais apresentaram lesões não displásicas compatíveis com hiperplasia e hiperqueratose na mucosa oral, enquanto 80% não apresentaram nenhuma alteração histológica na pele. Nesse sentido, podemos sugerir que ambas as formulações estudadas possuem um potencial quimiopreventivo em modelo animal de carcinogênese bucal.

Palavras-chave: Câncer bucal; Desordens Potencialmente Malignas; Leucoplasia; Quimioprevenção; Imiquimode; Nanotecnologia.

ABSTRACT

This thesis is based on the need for new chemopreventive approaches for potentially malignant disorders (PMDs), aiming to prevent oral cancer and improve patient adherence to treatments and quality of life. In this context, nanotechnological formulations were developed to deliver the drug imiquimod specifically to the oral mucosa. Two formulations were employed in this thesis: the first is novel, consisting of a nanotechnological biofilm containing 5% imiquimod protected by a patented invention; the second is the nanoencapsulated hydrogel containing 0.05% imiquimod, previously developed and characterized, but its chemopreventive potential had not been evaluated in an *in vivo* model of oral carcinogenesis until now. Both formulations were designed to enhance the effects of the drug imiquimod. *In vitro* and *in vivo* assays demonstrated that the biofilms have chemopreventive potential due to the unique combination of their components. The biofilms with nanocapsules exhibit greater mucoadhesiveness, regardless of the presence of imiquimod, both on mucin discs ($p=0.004$) and on fresh porcine oral mucosa ($p=0.000$). The nanocapsules also enhanced the drug permeation in the Fnc_imq formulation across all assessed time points, in comparison to the Fimq formulation ($p=0.0002$). Furthermore, the developed biofilm showed no irritant profile when evaluated using the HET-CAM methodology. In the cell culture study, no cytotoxicity was observed in non-tumoral cells, however, the innovative biofilm exhibited cytotoxicity towards SCC9 cells. In the *in vivo* study, the majority of animals where carcinogenesis was induced with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and treated with this formulation displayed no clinical or histopathological alterations in the oral mucosa and skin. The hydrogel containing 0.05% nanoencapsulated imiquimod also demonstrated to be a potential chemopreventive approach in the *in vivo* studies. Most animals showed no clinical changes in the oral mucosa and skin. From a histological perspective, 60% of the animals presented non-dysplastic lesions consistent with hyperplasia and hyperkeratosis in the oral mucosa, while 80% showed no histological alterations in the skin. In this context, we can suggest that both studied formulations possess chemopreventive potential in an animal model of oral carcinogenesis.

Keywords: Oral cancer; Potentially Malignant Disorders; Leukoplakia; Chemoprevention; Imiquimod; Nanotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4NQO - 4-Nitroquinoline 1-oxide
BFGF - Fibroblast Growth Factor Basic
CAM - Membrana corioalantóica
CAM-TBS- Teste de coloração de membrana corioalantóica-Azul de tripano
CAL 27- Human tongue squamous cell carcinoma cell line
CBC - Carcinoma basocelular
CCP - Câncer de cabeça e pescoço
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC - Carboximetilcelulose
COX - Ciclooxygenase
DP - Desvio padrão
DPM - Desordem potencialmente maligna
DMBA - 7,12-dimetilbenz [a]ntraceno
FDA- Food and Drug Administration
F - Filme
FIB- Fibroblastos
Fnc - Filmes com nanocápsulas
F_imq - Filmes com imiquimode 5% livre
Fnc_imq- Filmes com nanocápsulas e imiquimode 5%
FSO - Fibrose submucosa oral
HACAT- Keratinocytes
HET-CAM - Teste de membrana corioalantóica de ovos de galinha
Hg - Hidrogel com quitosana
Hgimq - Hidrogel com quitosana e imiquimode livre
HgNCimq - Hidrogel com quitosana e imiquimode 0.05% nanocencapsulado
HPC - hidroxipropilcelulose
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose
IL - Interleucinas
IMQ - Imiquimode
IFN- γ - Inibidor endógeno da angiogênese
INCA - Instituto Nacional de Câncer
LVP- Leucoplasia verrucosa proliferativa
MI - Moderadamente irritante

NC - Núcleo lipídico

NF-KB - Fator nuclear kappa B

NI - Não irritante

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCL - Polímero de policaprolactona

PG - Propilenoglicol

PMD- Potentially malignant disorders

PVA - Poli (álcool vinílico)

PVP- Polivinilpirrolidona

QA - Queilite actínica

REBEC - Base de registros de ensaios clínicos brasileiros

S - Ligeiramente irritante

SCC- Squamous cell carcinoma

SCC9 - Human squamous cell carcinoma cell line

SI - Severamente irritante

SiHa - Cultura de células de câncer cervical

SRB-Sulforhodamine B

TBS - Coloração azul de tripano

TLR - Receptores toll-like

TH1 - T-helper 1

TNF - Fator de necrose tumoral

TPGS - d- α -tocoferil polietileno glicol 100 succinato.

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular “Vascular endothelial growth factor”

WHO - Organização mundial da saúde “World Health Organization”

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	11
1.1 Câncer de Boca e Desordens Potencialmente Malignas.....	11
1.2 Imiquimode.....	16
1.3 Mucosa oral e Sistemas Mucoadesivos.....	19
1.4 Nanocápsulas Poliméricas.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. Delineamento do Estudo.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1: ARTIGO 1- Chemoprevention in oral leukoplakia: Challenges and current landscape.....	35
CAPÍTULO 2: ARTIGO 2- Is imiquimod a promising drug to treat oral mucosa diseases? A scoping review and new perspectives.....	43
CAPÍTULO 3: Redação da Patente.....	72
CAPÍTULO 4: ARTIGO 3- Mucoadhesive polymeric biofilms with imiquimod for chemoprevention of oral cancer: An in vitro and animal model study.....	108
CAPÍTULO 5: ARTIGO 4- Hydrogel containing polymeric nanocapsules-loaded imiquimod for chemoprevention of oral cancer: An animal model study of oral carcinogenesis.....	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS	146
ANEXO 1 - PARECER DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS.....	148
ANEXO 2- PARECER DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS.....	149

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

1.1 Câncer de Boca e Desordens Potencialmente Malignas

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) abrange uma variedade de doenças heterogêneas que se originam na região da cabeça e pescoço, incluindo cânceres que se originam na cavidade bucal, nasofaringe, orofaringe, laringe e hipofaringe. Cada subtipo dentro desse grupo está associado a uma etiologia específica, tendências epidemiológicas e terapias específicas (DHULL AK et al., 2018). A ocorrência de CCPs é mais prevalente em nações em desenvolvimento, principalmente na região do Sudeste Asiático, e é mais frequente em indivíduos do sexo masculino em comparação com o sexo feminino (MARUR S e FORASTIERE AA, 2016; SIEGEL RL et al., 2022).

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais frequente na cavidade bucal, representando aproximadamente 90% das neoplasias malignas que acometem os diversos sítios anatômicos intrabucais (BRENER et al., 2007; DRAGOMIR et al., 2010) e é o sexto câncer mais comum em todo o mundo (SHIBATA H et al., 2021). Somente no Brasil, para cada ano do triênio 2023/2025, 22.890 novos casos de câncer bucal e laringe (BRASIL, 2023). O câncer de boca é o quinto mais comum nos homens brasileiros e apresenta alta mortalidade (aproximadamente 50%) e alta morbidade, os sobreviventes enfrentam mutilações que impactam de forma significativa sua qualidade de vida (GARCÍA-MARTIN et al., 2019).

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de câncer na cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe envolvem exposição ao tabaco, dependência alcoólica e a presença de vírus oncogênicos, que estão associados a cânceres na nasofaringe e língua. Observa-se um aumento na incidência de câncer de orofaringe relacionado ao papilomavírus humano ao longo das últimas décadas (DHULL AK et al., 2018).

O câncer bucal pode ser precedido por lesões conhecidas como desordens potencialmente malignas (DPM). Estas integram um conjunto de alterações morfológicas teciduais com maior potencial de transformação maligna quando comparadas aos tecidos normais (WARNAKULASURIYA et al., 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) cita as seguintes DPMs da cavidade bucal: leucoplasia, eritroplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, queilite actínica, fibrose submucosa, líquen plano e atrofia por deficiência de

ferro. Dentre as DPM, podem ser citadas como mais comuns no ocidente a leucoplasia, a eritroplasia, a queilite actínica e o líquen plano bucal (WHO, 2022).



Figura 1. A) Imagem clínica de uma lesão exofítica com ulceração central em borda de língua de paciente diagnosticada após biópsia como carcinoma espinocelular. B) Leucoplasia em bordo de língua observada em 2013. C) Mesmo paciente da imagem B, leucoplasia evolui para carcinoma espinocelular após sucessivas excisões cirúrgicas 7 anos após diagnóstico inicial. **Fonte:** Arquivo do serviço de patologia bucal e estomatologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

A definição mais recente, apresenta as leucoplasias bucais como placas brancas de possível malignização após excluídas daquelas lesões que não transportam tal risco (WARNAKULASURIYA et al., 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define leucoplasia bucal como uma mancha ou placa branca não removível à raspagem que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra doença (WHO, 2017). O termo leucoplasia é estritamente clínico e não implica uma alteração tecidual histopatológica específica, o diagnóstico é dado por exclusão de outras alterações que surgem como placas brancas bucais, como líquen plano, leucoedema, nevo branco esponjoso, estomatite nicotínica, entre outras (NEVILLE et al., 2016).

Das desordens potencialmente malignas, a leucoplasia bucal é a mais prevalente (FELLER et al., 2012; TORRAS; ESCODA, 2015). Uma clássica revisão sistemática demonstrou que as estimativas da prevalência global de leucoplasias bucais variam de 0,5% a 3,46% e que a taxa de prevalência estimada combinada de leucoplasia bucal em 2003 variou entre 1,7 a 2,7% na população geral (PETTI, 2003). Recentemente, uma revisão sistemática mostrou que a prevalência de leucoplasia bucal foi de 4.11%, uma taxa maior do que a do estudo anterior, os autores sugerem que essa diferença pode ser devido a metodologia utilizada nos estudos incluídos, pois a maioria foram conduzidos em populações de centros de diagnósticos, portanto, esses não são ideais para investigar a prevalência de doenças (MELLO et al., 2018). Uma pesquisa realizada em pacientes no sul do Brasil avaliou a prevalência de lesões na mucosa bucal e observou uma frequência de

1,1% de leucoplasias, estas predominaram em pacientes do sexo masculino, etilistas e fumantes (CARRARD et al., 2011).

Um estudo de coorte, publicado por Wang e colaboradores (2019), realizou uma análise retrospectiva em uma amostra representativa da população chinesa diagnosticada com leucoplasia bucal entre 1998 e 2017 na Escola da Universidade de Pequim e no Hospital de Estomatologia. Foram acompanhados 875 pacientes e a incidência de transformação maligna de leucoplasia bucal foi de 12,2% e o tempo médio de seguimento foi de 4,5 anos. Nestes achados as mulheres eram mais propensas a ter leucoplasia do que homens em uma proporção de 2:1 e a taxa de transformação maligna também foi maior em mulheres. A leucoplasia bucal foi frequentemente encontrada em faixas etárias maiores, 65,7% dos pacientes tinham mais de 50 anos, e a maior taxa de transformação maligna foi observada nos pacientes de 50 a 59 anos. Os locais mais comuns acometidos pela lesão foram a língua (38,9%) e mucosa bucal (35,9%). As lesões no lábio (2,1%) e no assoalho da boca (3,7%) eram relativamente raras, enquanto apresentavam a maior taxa de transformação maligna (27,8%), seguida pela língua (16,8%). O exame histopatológico revelou ausência de displasia epitelial em 56% dos pacientes, seguida por displasia epitelial leve e moderada (31,5%), displasia epitelial severa (7,9%) e leucoplasia verrucosa proliferativa (4,6%). As taxas de transformação maligna para ausência de displasia, displasia leve e moderada, displasia grave e leucoplasia verrucosa proliferativa foram de 3,7%, 19,2%, 44,9% e 12,5%, respectivamente. Entre todos os pacientes, 18,9% eram fumantes e 12,9% eram etilistas. No entanto, a taxa de transformação maligna em pacientes não fumantes ou em ex-fumantes foi maior (14,4%) em comparação aos fumantes atuais (WANG et al., 2019).

As variantes clínicas da leucoplasia são frequentemente subdivididas em homogênea e não-homogênea. As do tipo homogênea se apresentam como uma lesão fina, plana, de superfície lisa ou relativamente lisa, de coloração branca e uniforme, entretanto, ela pode ou não apresentar sulcos ou fissuras. As leucoplasias do tipo não-homogêneas podem ser nodulares ou verrucosas, com superfícies enrugadas ou onduladas (irregulares), ou ainda podem ser uma mistura de áreas brancas e vermelhas denominadas eritroleucoplasias (VAN DER WAAL, 2009; FELLER; LEMMER, 2012; LODI et al., 2016). Leucoplasias com aspecto clínico não-homogêneo, possuem um maior risco de transformação maligna (20-25%) do que as leucoplasias homogêneas (0,6-5%) (VAN DER WAAL, 2009; FELLER; LEMMER, 2012).

As características histológicas das leucoplasias são variáveis e se caracterizam por distúrbios de proliferação e maturação epiteliais. Podem ser observadas hiperortoceratose ou

hiperparaceratose, hiperplasia epitelial, acantose ou atrofia do epitélio escamoso, ou então alterações displásicas epiteliais de vários graus (leve, moderado ou severa), ou carcinoma espinocelular (LODI et al., 2016; WHO, 2017). As displasias epiteliais também podem ser avaliadas pelo sistema binário de classificação, classificando-as em risco alto ou baixo para transformação maligna (KUJAN et al., 2006).

A prevalência de displasia epitelial na leucoplasia bucal varia de 5% a 25% (NEVILLE et al., 2009), sendo que é mais comumente identificada em leucoplasias não-homogêneas do que em homogêneas (FELLER; LEMMER, 2012). A presença de displasia epitelial é um marcador do potencial maligno da leucoplasia bucal e o risco da lesão leucoplásica evoluir para um carcinoma se intensifica com o aumento do grau de displasia do epitélio (SILVERMAN; GORSKY; LOZADA, 1984; FELLER; LEMMER, 2012).

O manejo terapêutico das leucoplasias frequentemente inclui remoção cirúrgica. No entanto, diversas modalidades terapêuticas já foram estudadas, como criocirurgia, cirurgia a laser (CHANDU et al., 2005) administração tópica ou sistêmica de retinóides (CHIESA et al., 2005; SOOD et al., 2005) terapia de enxaguatório bucal contendo adenovírus (RUDIN et al., 2003) e terapia fotodinâmica (KVAAL; WARLOE, 2007). O motivo para tratar a leucoplasia é uma tentativa de impedir a sua transformação maligna, mesmo que ainda não haja evidências científicas de que o tratamento, seja qual for a modalidade, impeça o possível desenvolvimento de um carcinoma espinocelular no futuro (LODI et al., 2008). Tratar leucoplasias independentemente de apresentar ou não displasia epitelial é considerada uma prática segura por parte dos profissionais (TRATATI et al., 1997; VAN DER WAAL, 2009).

Holmstrup e colaboradores (2006) realizaram um estudo retrospectivo com o objetivo de verificar o resultado a longo prazo de intervenções cirúrgicas e acompanhamento sem cirurgia de leucoplasias e eritroleucoplasias. De um total de 269 lesões, 254 eram leucoplasias e destas, 85 foram tratadas cirurgicamente. Os autores mostram que a intervenção cirúrgica parece não impedir o desenvolvimento de malignidade. Esse resultado corrobora com a revisão sistemática de Mehanna e colaboradores (2009) que mostra que a excisão cirúrgica parece diminuir, mas não impede o risco de transformação maligna das DPM.

As taxas de recorrência da leucoplasia, após remoção cirúrgica chegam a quase 30% (VAN DER HEM et al., 2005) e não há dados científicos disponíveis sobre intervalos ideais de acompanhamento das lesões após o tratamento. Esse dado seria muito importante para o diagnóstico precoce de possíveis recidivas, porém alguns intervalos são sugeridos: para leucoplasias que não apresentam displasia epitelial o acompanhamento de pacientes tratados

e não tratados deve ser em intervalos regulares de 6 meses; Já em leucoplasias que apresentam displasia epitelial os intervalos regulares entre as consultas passam a ser de 3 meses. A dúvida que permanece é se esse acompanhamento deve ser vitalício ou não (VAN DER WAAL, 2009).

A quimioprevenção dirigida ao local representa uma alternativa para o manejo de distúrbios potencialmente malignos, visto que, é uma estratégia de baixo risco e não invasiva (tópica) (SVIDER et al.,2016). A transição de uma lesão potencialmente maligna para um carcinoma espinocelular, ou seja, a carcinogênese, de certa forma é um processo longo; portanto estratégias de quimioprevenção podem ser desenvolvidas para desacelerar, interromper ou reverter esse processo (CHAU et al., 2017). As terapias tópicas apresentam vantagens como a diminuição da toxicidade dos quimiopreventivos, e eles podem ser aplicados além das margens clínicas das lesões, tentando diminuir ou até mesmo eliminar o risco de recidivas (SVIDER et al.,2016).

Até o momento os quimiopreventivos que foram testados em leucoplasias em ensaios clínicos incluem: bleomicina (EPSTEIN et al., 1998), retinóides (SCARDINA et al., 2005), adenovírus, inibidores da ciclooxigenase (COX) (PAPADIMITROKOPOULOU et al.,2008), terapia fotodinâmica (GAIMARI et al., 2016) e beta-caroteno (NAGÃO et al., 2015).

Apesar de nos últimos anos diversos estudos terem sido realizados para testar a eficácia de agentes quimiopreventivos em leucoplasias, uma revisão sistemática e meta-análise, de ensaios clínicos randomizados, não encontrou diferenças estatisticamente significativas na comparação da eficácia dos agentes quimiopreventivos avaliados em comparação ao placebo (XIE; LIU, 2017).

A revisão sistemática escrita por Chau e colaboradores (2017) demonstrou que retinóides tópicos, bleomicina, adenovírus e a terapia fotodinâmica levam a diminuição das lesões, porém essa diminuição é temporária e existem algumas limitações nos estudos incluídos nesta revisão, como tamanho da amostra insuficiente, tempo de acompanhamento inferior a 5 anos e também poucos estudos eram ensaios clínicos randomizados controlados.

É importante ressaltar que a terapia tópica pode incluir absorção sistêmica, o que poderia originar efeitos adversos. Neste sentido, os efeitos adversos relatados na terapia retinóide tópica incluem eritema, xerostomia, queimação na língua (EPSTEIN et al., 1999), mucosite, queilite, lábios secos, epistaxe, dor de cabeça, conjuntivite (SHAH et al., 1983).

A utilização de agentes quimiopreventivos tópicos entre os pacientes com lesões bucais podem ser um complemento viável ou mesmo alternativo para tradicional cirurgia, com o benefício de reduzir os efeitos secundários sistêmicos e preservação de estruturas anatômicas importantes (CHAU et al., 2017). No entanto, a eficácia a longo prazo da quimioprevenção tópica para leucoplasia ainda não foi estabelecida, e a escolha de agentes quimiopreventivos requer um estudo mais aprofundado (XIE; LIU, 2017). Estudos futuros devem minimizar o efeito das limitações, avaliando novos agentes quimiopreventivos em ensaios clínicos controlados, randomizados com acompanhamento a longo prazo e exames histológicos são necessários para avançarmos neste cenário (XIE; LIU, 2017; CHAU et al., 2017).

1.2 Imiquimode

Imiquimode é um fármaco que foi aprovado em 1997 pelo Food and Drug Administration (EUA) para aplicação tópica e tem como mecanismo de ação modificar a resposta imune, aumentando a imunidade adaptativa e atuando como agente antitumoral (SMITH et al., 2002).

Esse fármaco foi inicialmente utilizado para o tratamento de verrugas genitais e perianais e doença de Bowen. Posteriormente ele passou a ser utilizado também para o tratamento de carcinoma basocelular e ceratose actínica (uma lesão potencialmente maligna em pele) (MCDONALD et al., 2010; KOPERA; KERL, 2014). O estudo de Kopera e Kerl (2014) mostra que o uso tópico do creme de imiquimode a 5% é capaz de detectar ceratoses actínicas subclínicas e tratá-las mesmo antes de serem diagnosticadas clinicamente e que nesses pacientes o imiquimode pode ser capaz de impedir a evolução da lesão para um carcinoma. O uso de imiquimode no tratamento de ceratose actínicas é recomendado no *guidelines* da Associação Britânica de Dermatologistas publicado em 2017 (DE BERKER et al., 2017). Mais recentemente, imiquimode se tornou o tratamento de primeira escolha para neoplasias intraepiteliais vulvares (TRUTNOVSKY et al., 2022).

A primeira tentativa experimental de utilizar o imiquimode como agente terapêutico em lesões displásicas da mucosa bucal, foi descrita por Gkoulioni e colaboradores (2010). Nesse estudo as lesões displásicas foram induzidas em ratos Wistar, que após foram tratados com creme contendo imiquimode 5% aplicado três vezes por semana por dezesseis semanas. O imiquimode foi capaz de fazer com que ocorresse a regressão da severidade histológica das lesões em todas as amostras. Esses resultados sugerem que o imiquimode pode ser eficaz na regressão da carcinogênese bucal.

Semelhantemente, um relato de caso clínico demonstrou que aplicação tópica de imiquimode foi eficaz no tratamento de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). Nesse caso, a paciente utilizou um creme contendo imiquimode 5%, três vezes por semana, à noite, na lesão que estava localizada em lábio inferior durante seis semanas. Após o término do tratamento, foi observada a cicatrização completa da lesão, ou seja, não havia evidência clínica de LVP. Uma nova biópsia foi realizada e mostrou a ausência de hiperplasia e áreas displásicas, após seis meses de acompanhamento a paciente não apresentou novas lesões, mas o acompanhamento continuou sendo realizado devido às altas taxas de recorrência e risco de transformação maligna da lesão (LOPEZ et al.,2017).

A ação antitumoral do imiquimode é fundamentada principalmente na ativação do sistema imunológico inato, onde células dendríticas cutâneas parecem ser as células responsivas primárias. A estimulação dessas células dendríticas é seguida por uma profunda resposta imune celular dirigida para a lesão. O imiquimode também, quando administrado topicamente, induz a maturação funcional das células epidérmicas de Langerhans *in vivo* e estimula a migração dessas células apresentadoras de antígenos para os linfonodos regionais, ao que tudo indica elas promovem uma resposta específica das células T (STANLEY, 2002).

Os principais efeitos biológicos do imiquimode são mediados pela atividade agonística em relação aos receptores toll-like (TLR) 7 e 8 e, sucessivamente, à ativação do fator nuclear kappa B (NF-KB). Como resultado dessa atividade ocorre a indução de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) -2, IL-6, IL-8, IL-12, quimiocinas e outros mediadores, levando à ativação de células apresentadoras de antígenos e outros componentes da imunidade inata e, eventualmente, acarretar em uma resposta imune celular antitumoral profunda ponderada por T-helper (Th1). Vários efeitos secundários no nível molecular e celular também podem ser explicados, pelo menos em parte, pela ativação do NF-KB (SCHÖN, 2007).

Além disso, independente do TLR-7 e TLR-8, o imiquimode parece interferir nas vias de sinalização do receptor de adenosina e o composto causa redução independente da receptora da atividade da adenilil ciclase. Este novo mecanismo pode aumentar a atividade pró-inflamatória do composto através da supressão de um mecanismo de feedback regulatório negativo que normalmente limita as respostas inflamatórias (HEMMI et al., 2002; SCHÖN, 2007).

O imiquimode em altas concentrações também pode induzir a apoptose das células tumorais *in vitro*. Nesse contexto, o fármaco levou ao aumento da expressão do receptor de morte CD95 (Fas) e à diminuição da expressão da proteína antiapoptótica *B-cell lymphoma*

2 (*Bcl-2*), sugerindo que o mesmo aumenta a suscetibilidade das células tumorais a estímulos apoptóticos. Essa atividade pró-apoptótica do imiquimode poderia ser mediada através da regulação dependente de TLR (SCHÖN, 2007; BERMAN et al., 2003). No entanto, estudos demonstraram que o imiquimode também pode exercer atividade pró-apoptótica direta contra células tumorais cultivadas, achado confirmado em tumores de origem diferente *in vivo* (SULLIVAN et al., 2003; SCHÖN et al., 2004).

Alguns estudos mostram que o imiquimode apresenta também propriedade anti-angiogênica, demonstrando o seu papel na inibição do crescimento patológico de novos vasos. Ele é capaz de aumentar os níveis de IL-10 e IL-12, os quais inibem a angiogênese e diminuem a produção celular de vários fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento de fibroblastos, IL-8 e ativador do plasminogênio do tipo uroquinase. Além disso, o aumento dos níveis de IL-10 e IL-12 inibem a motilidade vascular e induzem a apoptose de células endoteliais (LI et al., 2005; DESAI et al., 2012; MICALLI et al., 2014). A IL-12 isoladamente, inibe a proliferação endotelial e a formação de tubos em *in vitro* e angiogênese *in vivo*. Seus mecanismos incluem regulação positiva de IFN- γ (inibidor endógeno da angiogênese), diminuindo a produção de VEGF, bFGF, inibição da migração e invasão endotelial (YAO et al., 1999; DUDA et al., 2000; LI et al., 2005). O mecanismo antiangiogênico da IL-10 está correlacionado ao aumento da expressão de inibidores TSP-1 e TSP-2 (KOHMO et al., 2003; KAWAKAMI et al., 2001; LI et al., 2005). No geral, a modulação sinérgica de várias funções biológicas por um único composto representa um princípio interessante da terapia antitumoral.

O imiquimode encontra-se disponível no mercado sob a forma farmacêutica de creme a 5% (Aldara ® 3M) e creme a 3,75% (Zyclara ® Medcis). O primeiro é utilizado para o tratamento de carcinomas basocelulares superficiais, ceratoses actínicas e verrugas externas da região genital e anal, já o segundo somente para o tratamento de ceratoses actínicas da face e couro cabeludo (EDWARDS et al., 2000; SOTIRIOU et al., 2011; MICALLI et al., 2014). A formulação de imiquimode 5% geralmente é administrada sob a lesão três vezes por semana e deve permanecer em contato por no mínimo 6 horas, por isso sugere-se que seja aplicada à noite por um período de 8 a 16 semanas (KREUTER et al., 2008). No entanto, outros regimes de administração são encontrados, como o de cinco vezes por semana por um período de 6 semanas (MICALLI et al., 2014).

Alguns efeitos adversos ocorrem em pacientes que fazem o uso tópico do imiquimode, sendo a maioria efeitos locais que podem variar de intensidade leve a grave como edema, eritema, queimação, irritação, ulceração e dor. O grau de eritema local que ocorre naqueles pacientes que aderem ao tratamento é em virtude da liberação das citocinas

pró-inflamatórias, como parte do mecanismo de ação do fármaco (KREUTER et al., 2008). O imiquimode também pode desenvolver reações sistêmicas que incluem fadiga, febre, sintomas de gripe, distúrbios do sistema nervoso periférico, cefaléia e diarreia (WIELAND et al., 2006; KREUTER et al., 2008). Frente a esses efeitos adversos é de suma importância comunicar os pacientes previamente que serão submetidos ao tratamento (CHAKRABARTY et al., 2005; SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010).

Considerando a incidência dos efeitos adversos reportados com o uso de imiquimode 5% é desejável que outras formulações sejam desenvolvidas e estudadas a fim de avaliar seu efeito e propor como alternativa ao tratamento visando o aumento da qualidade de vida do paciente.

1.3 Mucosa oral e Sistemas Mucoadesivos

A mucosa bucal tem sido amplamente explorada como um sítio para a liberação de fármacos devido às suas características anatômicas e fisiológicas favoráveis. Diversas vias de administração de fármacos podem utilizar sistemas mucoadesivos, incluindo bucal, oral, vaginal, retal, nasal e ocular (MAHAJAN et al., 2013). A aplicação de formas farmacêuticas mucoadesivas começou a ser explorada na década de 1980, com o desenvolvimento de pomadas, géis e comprimidos mucoadesivos para uso na cavidade oral (VITALIY, 2012). A via oral é uma rota amplamente utilizada para a administração de fármacos por meio de sistemas mucoadesivos (MAHAJAN et al., 2013).

O processo de mucoadesão ocorre através da utilização de polímeros mucoadesivos (MAHAJAN et al., 2013). Esses polímeros são macromoléculas hidrofílicas que possuem grupos funcionais capazes de estabelecer ligações de hidrogênio, resultando em hidratação e aumento de volume quando em solução aquosa (DIAS et al., 2007). Para que ocorra a mucoadesão, é necessário que o polímero se ligue à superfície da mucosa, podendo ocorrer ligações primárias fortes, como ligações covalentes, ou ligações secundárias mais fracas, como ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e hidrofóbicas (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2006; TARDELLI, 2010).

A administração de sistemas mucoadesivos na cavidade oral apresenta benefícios significativos, como ação rápida e proteção contra a degradação do fármaco em um ambiente ácido, e proteção contra o metabolismo de primeira passagem, liberação controlada do fármaco, direcionamento do fármaco para local ou tecido específico. Além disso, é uma via de administração acessível e amplamente aceita (MAHAJAN et al., 2013).

Até o presente momento, três biofilmes contendo imiquimode foram propostos para esse propósito e possuem limitações. A primeira formulação é um filme baseado em polivinilpirrolidona (PVP) e carboximetilcelulose (CMC) proposto por Raminemi et al. (2013). De acordo com os autores, a incorporação do IMQ foi realizado usando solventes da classe 2 da ICH (ICH Q3D GUIDELINE FOR ELEMENTAL IMPURITIES), como metanol e tolueno, os quais precisam ser substituídos, embora a concentração residual deles na formulação tenha ficado abaixo dos limites estabelecidos pelas diretrizes do FDA. Além disso, foi avaliado o tempo de residência do filme em mucosa oral de hamsters e humanos, entretanto, o efeito quimiopreventivo do biofilme não foi avaliado (RAMINENI et al., 2014). Um biofilme contendo imiquimode baseado em quitosana e alginato também foi proposto, no entanto, os autores consideram que ele apresenta biodisponibilidade e efetividade limitada devido ao fato de que uma porção significativa do fármaco não é solubilizada dentro da matriz (CAMARGO et al., 2021; REMIRO et al., 2022). No estudo conduzido por Remiro e seus colaboradores (2022), foram preparados três tipos distintos de hidrogéis à base de carboximetilquitosana, alginato de sódio e goma xantana em diversas combinações. A incorporação de imiquimode foi realizada com sucesso utilizando uma formulação micelar à base de d- α -tocoferil polietileno glicol 100 succinato (TPGS). A utilização do IMQ encapsulado em TPGS e micelas de ácido oleico possibilitou o eficaz carregamento do IMQ em formulações aquosas de polissacarídeos e melhorou sua penetração e retenção no tecido mucoso, este era um estudo *in vitro* e *ex-vivo*. No entanto, nenhum teste *in vivo* foi realizado.

1.4 Nanocápsulas Poliméricas

Nanomateriais são estruturas que possuem tamanho de partícula na escala nanométrica; ou seja, abaixo de 1000 nm. Dentre esses nanomateriais com aplicações farmacêuticas e biológicas, as nanopartículas poliméricas se destacam para uso clínico. Elas podem ser divididas em duas categorias: as vesículas poliméricas, também conhecidas como nanocápsulas, e as matrizes coloidais, conhecidas como nanoesferas. As nanocápsulas poliméricas são estruturas nanométricas compostas por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica (COUVREUR et al., 2002).

A nanoencapsulação de fármacos permite uma maior penetração do mesmo na mucosa devido ao tamanho reduzido das partículas e interação efetiva com o muco, possibilitando o transporte do fármaco através do epitélio de mucosa de forma passiva ou ativa. Além disso, o nanoencapsulamento apresenta a capacidade de penetrar entre as células,

permitindo a liberação do fármaco sem sofrer degradação extracelular (CONTRI et al., 2014a; ROHAN; SASSI, 2009).

As nanocápsulas poliméricas têm sido utilizadas para modular a penetração de substâncias nos tecidos, controlando sua liberação e aumentando o contato do fármaco com o estrato córneo ou o muco (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; FRANK et al., 2014; CAON et al., 2014). Isso resulta em uma maior eficácia do fármaco em comparação com fármacos não encapsulados (FONTANA et al., 2011). Além disso, essa tecnologia permite reduzir a incidência de efeitos adversos associados à aplicação tópica, controlando a liberação do fármaco encapsulado e reduzindo a dose total administrada (POPLE; SINGH, 2010; CONTRI et al., 2014).

A nanotecnologia tem sido utilizada para reduzir alguns efeitos adversos em mucosa causados por fármacos, como eritema, irritação, ulceração e dor, conforme evidenciado por Contri et al. (2014). As nanocápsulas poliméricas apresentam propriedades adesivas ao tecido; contudo, sua aplicação na forma de suspensões aquosas dificulta a adesão local. Para contornar essa limitação, incorporar as suspensões em sistemas semi sólidos, como o gel de quitosana, tem sido uma alternativa para aumentar a penetração, permeação e tempo de permanência do fármaco na mucosa (VALENTA; AUNER, 2004; FRANK et al., 2014; CONTRI et al., 2014; FRANK et al., 2017). A quitosana, é um polímero bioadesivo, que tem se destacado por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, mucoadesão e atividade antimicrobiana (CONTRI et al., 2014). Sua carga positiva promove a interação com a mucosa, aumentando a permanência e penetração da formulação (BONFERONI et al., 2008 PERIOLI et al., 2008; CONTRI et al., 2014a;). A quitosana pode ser utilizada em diferentes formas farmacêuticas, como hidrogéis, microsferas, filmes e revestimento de nanopartículas (BONFERONI et al., 2008; PERIOLI et al., 2008; ZHANG; KAWAKAMI, 2010).

As nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode foram desenvolvidas como uma formulação nanotecnológica para o tratamento de carcinoma basocelular (VENTURINI et al., 2015) e câncer cervical (FRANK et al., 2017). Essa formulação, devido às propriedades antitumorais e antivirais do imiquimode, tem potencial para ser utilizada em outras doenças, especialmente aquelas que afetam as mucosas, conforme demonstrado por Frank et al. (2017). Esses estudos também mostraram que as nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode apresentam a capacidade de superar barreiras e mucosas e aumentar a penetração do imiquimode, o que é desejável para o tratamento por exemplo, de queilite actínica. Além disso, a formulação desenvolvida por esses pesquisadores é eficaz em uma concentração 100 vezes menor do que a formulação comercial (FRANK et al., 2017;

FRANK et al., 2019). Isso é importante, considerando que altas concentrações de imiquimode podem levar ao surgimento de efeitos adversos, tornando desejável uma formulação com menor concentração do fármaco, mas ainda eficaz no tratamento.

A quitosana, quando utilizada como gel, possui a capacidade de controlar a liberação do fármaco e afetar a junção entre as células epiteliais, o que pode promover maior penetração através do tecido (VALENTA; AUNER, 2004). Estudos mostraram que o hidrogel de quitosana apresenta maior adesão em comparação com um gel comercial, quando aplicado em mucosa vaginal suína (PERIOLI et al., 2008; FRANK et al., 2017). Ao combinar o gel de quitosana com agentes antivirais, a formulação demonstrou alto potencial no controle da liberação, adesão ao tecido e segurança (PERIOLI et al., 2008). O uso de gel de quitosana contendo nanocápsulas catiônicas (EUDRAGIT RS 100) e aniônicas (EUDRAGIT S 100) na mucosa vaginal foi investigado, visando desenvolver uma nova formulação capaz de prolongar o tempo de permanência na mucosa e aumentar a penetração do fármaco encapsulado. Neste estudo, foi possível verificar a influência da carga positiva na adesividade e penetração das nanoformulações na mucosa. No entanto, devido ao fato de as nanocápsulas poliméricas serem produzidas como suspensões aquosas, sua aplicação específica em mucosas é um desafio.

Atualmente há um grande interesse na pesquisa na busca por novas formulações de aplicação tópica na região da mucosa oral, especialmente filmes orais, com o objetivo não apenas de evitar a deglutição, mas também de assegurar uma biodisponibilidade satisfatória. Embora um estudo recente tenha obtido sucesso ao desenvolver um novo filme orodispersível capaz de liberar gradualmente o princípio ativo ao incorporar micropastilhas (SPEER, 2019), a maioria dos filmes orodispersíveis é projetada para se dissolver ou desintegrar rapidamente na boca (STEINER et al., 2019), formando uma solução ou suspensão que é ingerida e absorvida pelo trato gastrointestinal (SPEER et al., 2019). Pelo contrário, o filme mucoadesivo é concebido para aderir especificamente à mucosa oral e promover a liberação controlada do fármaco (TRAN et al., 2019). Adicionalmente, filmes mucoadesivos com formulações e processos de fabricação personalizados podem ser empregados como sistemas multifuncionais de administração de medicamentos para terapia individualizada no futuro (STEINER et al., 2018).

Recentemente, uma série de estudos (LIM, 2018; MUSAZZI, 2018; DOMOKOS, 2019) foi relatada, focando no design e desenvolvimento de filmes orais com novas estratégias de formulação (DENG, 2018; TAKKALKAR, 2019; FAN, 2020). Dois estudos foram conduzidos visando a quimioprevenção da leucoplasia bucal através do desenvolvimento de biofilmes. Um dos estudos utilizou a técnica de impressão 3D para

produzir um filme mucoadesivo carregado com apigenina, um flavonoide conhecido por suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antitumorais. O filme foi submetido a testes em um modelo animal de carcinogênese induzida por 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO), os resultados demonstraram um efeito quimiopreventivo notável, com base na análise histopatológica por imunohistoquímica do espécime, indicando que o filme pode auxiliar na prevenção da carcinogênese. No segundo estudo, conduzido por Ramineni e colaboradores (2013), foram projetados filmes mucoadesivos utilizando misturas de polivinilpirrolidona e carboximetilcelulose suportadas por poli(etileno-co-acetato de vinila), o tempo de adesão do filme foi posteriormente avaliado em mucosa de hamsters e humanos pelos mesmos autores (RAMINENI et al, 2014), entretanto o potencial quimiopreventivo do filme não foi avaliado.

O objetivo desta tese foi desenvolver novas formulações nanotecnológicas e explorar o potencial de formulações nanotecnológicas já desenvolvidas e caracterizadas no grupo de pesquisa de nanotecnologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para a quimioprevenção do câncer de boca. Duas hipóteses distintas serão investigadas: A primeira hipótese centra-se no desenvolvimento e avaliação de um filme nanotecnológico mucoadesivo contendo imiquimode. Acredita-se que esse filme, aplicado localmente na cavidade bucal, poderá desencadear respostas imunológicas direcionadas para combater lesões que possuem um potencial de transformação maligna, reduzindo assim o risco de desenvolvimento de câncer de boca. O foco é conferir uma maior mucoadesão nos tecidos bucais para ampliar a eficácia da formulação, mantendo os princípios de segurança necessários para seu uso terapêutico. A segunda hipótese baseia-se na análise de uma nanoformulação já desenvolvida à base de hidrogel de quitosana, com resultados promissores em estudos *in vitro*. O estudo visa avaliar essa nanoformulação em um modelo animal para avaliar sua eficácia potencial na quimioprevenção do câncer de boca para que seja possível vislumbrar sua aplicação em ensaios clínicos de fase I.

REFERÊNCIAS

AK, Dhull et al. Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. *World Journal of Oncology*, v. 9, n. 3, p. 80–84, 2018.

BERMAN B, SULLIVAN TP, DE ARAUJO T, NADJI T. Expression of Fasreceptor on basal cell carcinomas after treatment with imiquimod 5% cream or vehicle. *Br J Dermatol*, v. 149, p. 59–61, 2003.

- BONFERONI, M. C. et al. Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery. Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, n. 2, p. 166–176, 2008.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023.
- BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.
- CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: A review. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 3719-3735, 2014. DOI: 10.2147/IJN.S61670.
- CAMARGO, L. G. et al. Development of bioadhesive polysaccharide-based films for topical release of the immunomodulatory agent imiquimod on oral mucosa lesions. *European Polymer Journal*, v. 151, p. 110422, 2021.
- CAON, T. et al. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 1, p. 165–172, 2014.
- CARRARD, V. C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. *Oral Diseases*, v.17, p. 171–179, 2011.
- CHAKRABARTY, A. K. et al. Aphthous ulcers associated with imiquimod and the treatment of actinic cheilitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 52, n. 2, p. 2004–2006, 2005.
- CHANDU A, SMITH AC. The use of CO2 laser in the treatment of oral white patches: outcomes and factors affecting recurrence. *Int J Oral Maxillofac Surg* n. 34, p. 396–400, 2005.
- CHAU, L, et al. Topical agents for oral cancer chemoprevention: A systematic review of the literature. *Oral Oncology*, v. 67, p. 153-159, 2017.
- CHIESA F, TRADATI N, GRIGOLATO R, BORACCHI P, BIGANZOLI E, CROSE N, ET AL. Randomized trial of fenretinide (4-HPR) to prevent recurrences, new localizations and carcinomas in patients operated on for oral leukoplakia: long-term results. *International Journal of Cancer*, v. 115, n. 4, p. 625–9, 2005.
- CONTRI, R. V. et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, n. 1, p. 951–962, 2014.
- CONTRI, R. V., KATZER, T., OURIQUE, A. F., DA SILVA, A. L. M., BECK, R. C., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *J Biomed Nanotechnol*, v. 10, n. 5, p. 820–830, 2014.

- COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, v. 19, n. 2, p. 99–134, 2002.
- DENG, L. et al. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocolloids*, v. 74, p. 324-332, 2018.
- DESAI T, CHEN CL, DESAI A, KIRBY W. Basic pharmacology of topical imiquimod, 5-fluorouracil, and diclofenac for the dermatologic surgeon. *Dermatol Surg*, v. 38, n.1, p. 97–103, 2012.
- DOMOKOS, A. et al. Continuous manufacturing of orally dissolving webs containing a poorly soluble drug via electrospinning. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 130, p. 91-99, 2019.
- DRAGOMIR, L. P. et al. Clinical, Epidemiological And Histopathological Prognostic Factors In Oral Squamous Carcinoma. *Current Health Sciences Journal*, v. 36, n. 4, 2010.
- DUDA, D. G. et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Research*, v. 60, n. 4, p. 1111–1116, 2000.
- EDWARDS L, OWENS ML, ANDRES KL, et al. A pilot study evaluating imiquimod 5% cream versus vehicle in the treatment of actinic keratoses. Poster presented at the 58th Annual Meeting of the American Academy of Dermatology. 2000.
- EPSTEIN JB, GORSKY M, WONG FL, et al. Topical bleomycin for the treatment of dysplastic oral leukoplakia. *Cancer*, v. 83, p. 629–634, 1998.
- EPSTEIN JB, GORSKY M. Topical application of vitamin A to oral leukoplakia: a clinical case series. *Cancer*, v. 86, p. 921–7, 1999. FAN, Y. et al. Taste-masking and colloidal-stable cubosomes loaded with Cefpodoxime proxetil for pediatric oral delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 575, p. 118875, 2020.
- FELLER L, LEMMER J. Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review. *Int J Dent*, v. 2012, p. 540-561, 2012.
- FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 79, n. 2, p. 241–249, 2011.
- FRANK, L. A. et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: A new formulation for vaginal drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, n. 1, p. 3151–3161, 2014.
- FRANK, L. A. et al. The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 114, p. 202–212, 2017.
- GAIMARI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of epithelial potentially malignant disorders of the mouth: advantages and disadvantages. *Sixth International Conference on Lasers in Medicine*, 2016.
- GARCÍA-MARTIN, J. Á. et al. Epidemiology of Oral Cancer. *Oral Cancer Detection*, v. 1, p. 81-93, 2019.

- GKOULIONI, V. et al. The efficacy of imiquimod on dysplastic lesions of the oral mucosa: An experimental model. *Anticancer Research*, v. 30, n. 7, p. 2891–2896, 2010.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 117739280700200, 2007.
- HEMMI, H. et al. Small-antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, v. 3, n. 2, p. 196–200, 2002.
- HOLMSTRUP P, VEDTOFTE P, REIBEL J, STOLTZE K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*, v. 42, p. 461–74, 2006.
- KAWAKAMI, T. et al. Interleukin 10 expression is correlated with thrombospondin expression and decreased vascular involvement in colon cancer. *Int J Oncol*, v. 18, p. 487–91, 2001.
- KOHNO, T. et al. Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer. *Cancer Research*, v. 63, n. 16, p. 5091–5094, 2003.
- KOPERA, D.; KERL, H. Visualization and treatment of subclinical actinic keratoses with topical imiquimod 5% cream: An observational study. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.
- KREUTER, A. et al. Imiquimod leads to a decrease of human papillomavirus DNA and to a sustained clearance of anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, n. 8, p. 2078–2083, 2008.
- KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*, v. 42, n. 10, p. 987–993, 2006.
- KVAAL SI, W. T. Photodynamic treatment of oral lesions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, v. 26, n. 2, p. 127–133, 2007.
- LEBWOHL, M. et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: Results from two phase III, randomized, double-blind, parallel group, vehicle-controlled trials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 50, n. 5, p. 714–721, 2004.
- LI VW, L. W., TALCOTT, K., ZHAI, A. Imiquimod as an antiangiogenic agent. *J Drugs Dermatol*, v. 4, p. 708-17, 2005.
- LIM, S. H. et al. 3D printed drug delivery and testing systems - a passing fad or the future? *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 132, p. 139-168, 2018.
- LODI, G. et al. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 7, 2016.
- LOPEZ, AM. et al. Successful treatment of proliferative verrucous leukoplakia with 5% topical imiquimod. *Dermatol Ther*, v. 30, n. 2, 2017.

- MAIA HC, et al. Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. *Einstein*, v. 14, n. 1, p. 35-40, 2016.
- MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 91, n. 3, p. 386–396, 2016.
- MCDONALD, C. et al. Treatment of actinic cheilitis with imiquimod 5% and a retractor on the lower lip: Clinical and histological outcomes in 5 patients. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 48, n. 6, p. 473–6, 2010.
- MAHAJAN, P. et al. Mucoadhesive Drug Delivery System: A Review. *Int. J. Drug Dev. & Res*, v. 5, n 1, p.11-20, 2013.
- MEHANNA H.M, RATTAY T, SMITH J, MCCONKEY CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Head and Neck*, v. 31, n. 12, p. 1600–1609, 2009.
- MELLO, F.W. et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med*, v. 47, n. 7, p; 633–640, 2018.
- MICALI, G. et al. Topical pharmacotherapy for skin cancer: Part I. Pharmacology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 70, n. 6, p. 965.e1–965.e12, 2014.
- MOHAMMED, M. A.; SYEDA, J. T. M.; WASAN, K. M.; WASAN, E. K. Uma visão geral das nanopartículas de quitosana e sua aplicação na administração de medicamentos não parenterais. *Pharmaceutics*, v. 9, p. 53, 2017.
- MUSAZZI, U. M. et al. Personalized orodispersible films by hot melt ram extrusion 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 551, n. 1-2, p. 52-59, 2018.
- NAGAO, T. et al. Treatment of oral leukoplakia with a low-dose of beta-carotene and vitamin C supplements: A randomized controlled trial. *International Journal of Cancer*, v. 136, n. 7, p. 1708–1717, 2015.
- NEVILLE, B. W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; JERRY, E.; BOUQUOT, J. E. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- PANDEY, M.; CHOUDHURY, H.; YING, J. N. S.; et al. Mucoadhesive Nanocarriers as a Promising Strategy to Enhance Intracellular Delivery against Oral Cavity Carcinoma. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 4, p. 795, 2022.
- PAPADIMITRAKOPOULOU, V. A. et al. Pilot randomized phase II study of celecoxib in oral premalignant lesions. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 7, p. 2095–101, 2008.
- PERIOLI, L. et al. Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, n. 1, p. 141–145, 2008.

- PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review, *Oral Oncology*, vol. 39, no. 8, p. 770–780, 2003.
- POPLE, P. V.; SINGH, K. K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 398, n. 1–2, p. 165–178, 2010.
- RAMINENI, S. K.; et al. A. Development of imiquimod-loaded mucoadhesive films for oral dysplasia. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 102, p. 593-603, 2013.
- RAMINENI, S. K.; et al. Competing Properties of Mucoadhesive Films Designed for Localized Delivery of Imiquimod. *Biomaterials Science*, v. 1, p. 753-762, 2013.
- RAMINENI, S. K.; et al. Local delivery of imiquimod in hamsters using mucoadhesive films and their residence time in human patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 118, p. 665-673, 2014.
- REMIRO, P. F. R. et al. An Alternative Device for the Topical Treatment of Oral Cancer: Development and Ex-Vivo Evaluation of Imiquimod-Loaded Polysaccharides Formulations. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 12, p. 2573, 2022.
- ROHAN, L. C.; SASSI, A. B. Vaginal Drug Delivery Systems for HIV Prevention. *The AAPS Journal*, v. 11, n. 1, p. 78–87, 2009.
- RUDIN, C.M. et al. An attenuated adenovirus, ONYX-015, as mouthwash therapy for premalignant oral dysplasia. *J Clin Oncol*, v. 21, n.24, p. 4546–52, 2003.
- SCARDINA GA, CARINI F, MARESI E, VALENZA V, M. P. Evaluation of the clinical and histological effectiveness of isotretinoin in the therapy of oral leukoplakia: ten years of experience: is management still up to date and effective? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, v. 28, n. 2, p. 115–119, 2005.
- SCHON M; SCHON MP. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Curr Med Chem*, v. 14, p. 681–7, 2007.
- SCHON MP, SCHON M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis*, v. 9, n. 3, p. 291–8, 2004.
- SHAH, J.P. et al. Effect of retinoids on oral leukoplakia. *Am J Surg*, v. 146, n. 4, p. 466–70, 1983.
- SHIBATA, H. et al. Immunotherapy for Head and Neck Cancer: A Paradigm Shift From Induction Chemotherapy to Neoadjuvant Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, v. 11, n. 9, p. 1-11, 2021.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 72, n. 1, p. 7-33, 2022.
- SILVERMAN S. JR., M. GORSKY, AND F. LOZADA, “Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients,” *Cancer*, v. 53, n. 3, p. 563–568, 1984.
- SMITH, K. J. et al. Topical 5% imiquimod for the therapy of actinic cheilitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2002.

- SPEER, I.; PREIS, M.; BREITKREUTZ, J. Dissolution testing of oral film preparations: Experimental comparison of compendial and non-compendial methods. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 561, p. 124-134, 2019.
- STANLEY MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol*, v. 27, n. 7, p. 571–7, 2002.
- STEINER, D.; FINKE, J. H.; KWADE, A. Instant ODFs - Development of an intermediate, nanoparticle-based product platform for individualized medication. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 126, p. 149-158, 2018.
- STEINER, D.; FINKE, J. H.; KWADE, A. SOFTs - Structured orodispersible film templates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 137, p. 209-217, 2019.
- SULLIVAN, T. P. et al. Evaluation of Superficial Basal Cell Carcinomas after Treatment with Imiquimod 5% Cream or Vehicle for Apoptosis and Lymphocyte Phenotyping. *Dermatologic Surgery*, v. 29, n. 12, p. 1181–1186, 2003.
- SVIDER, P.F. et al. Mucosal therapy for potentially malignant diseases and OSCC. In: Fribley AM, editor. *Targeting Oral Cancer*. Cham: Springer International Publishing, p. 283–99, 2016.
- TAKKALKAR, P. et al. Structural, thermal, rheological and optical properties of poly (lactic acid) films prepared through solvent casting and melt processing techniques. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 104, p. 293-300, 2019.
- TORRAS CC, ESCODA CG. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 20, n. 3, p. 305–15, 2015.
- TRADATI, N. et al. Oral leukoplakias: to treat or not? *Oral Oncol*, v. 33, n. 5, p.317–21, 1997.
- TRAN, P. H. L.; DUAN, W.; TRAN, T. T. D. Recent developments of nanoparticle-delivered dosage forms for buccal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 571, p. 118697, 2019.
- TRUTNOVSKY, G.; REICH, O.; JOURA, E. A.; et al. Topical imiquimod versus surgery for vulvar intraepithelial neoplasia: a multicentre, randomised, phase 3, non-inferiority trial [published correction appears in *Lancet*. 2022 Oct 8;400(10359):1194]. *Lancet*, v. 399, n. 10337, p. 1790-1798, 2022.
- VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, n. 2, p. 279–289, 2004.
- VAN DER HEM PS, NAUTA JM, VAN DER WAL JE, ROODENBURG JL. The results of CO2 laser surgery in patients with oral leukoplakia: a 25 year follow up. *Oral Oncol*, v. 41, n. 1, p. 31–7, 2005.
- VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. *Oral Oncol*. v. 45, p. 317–323, 2009.

VENTURINI, C. G. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: Promising formulations against skin carcinoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 79, p. 36–43, 2015.

VILLA A, VILLA C, ABATI, S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Aust Dent J*, v. 56, n. 3, p. 253–6, 2011.

WANG, T. et al. Development and Validation of Nomogram for Prediction of Malignant Transformation in Oral Leukoplakia: A Large-Scale Cohort Study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 48, n. 6, p. 491–498, 2019.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Diseases*, v. 27, n. 8, p. 1862-1880, nov. 2021. DOI: 10.1111/odi.13704.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 36, n. 10, p. 575–580, 2007.

WHO. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Press, 2017.

WIELAND, U. et al. Imiquimod treatment of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men. *Archives of Dermatology*, v. 142, n. 11, p. 1438–1444, 2006.

XIE, T; LIU, J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis, *J Pak Med Assoc*, v. 67, n. 9, p. 1415–1419, 2017.

YAO L, SGADARI C, FURUKE K, BLOOM ET, TERUYA-FELDSTEIN J, T. G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood.*, v. 93, n. 5, p. 1612–1621, 1999.

ZHANG, S.; KAWAKAMI, K. One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 397, n. 1–2, p. 211–217, 2010.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desta tese foi desenvolver e caracterizar um biofilme nanotecnológico contendo imiquimode 5%, bem como avaliar a sua segurança e eficácia em modelos *in vitro* e *in vivo* focando na quimioprevenção de carcinogênese bucal. Além disso, esta tese buscou avaliar o desempenho de um hidrogel contendo imiquimode 0,05% nanoencapsulado na quimioprevenção da carcinogênese bucal.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar um biofilme associado a nanocápsulas poliméricas para uso em mucosa bucal contendo imiquimode na concentração 5%;
- Proteger a inovação tecnológica por meio de um depósito de patente;
- Avaliar o efeito da inovação tecnológica *in vitro*, em células não-tumorais e tumorais;
- Avaliar o efeito quimiopreventivo do biofilme inovador no aspecto clínico e histológico em lesões induzidas em modelo animal de carcinogênese;
- Avaliar o efeito quimiopreventivo do hidrogel contendo imiquimode 0,05% nanoencapsulado no aspecto clínico e histológico em lesões induzidas em modelo animal de carcinogênese bucal.

3. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para alcançar os objetivos, a condução deste trabalho ocorreu em quatro etapas principais, que são apresentadas em formato de quatro artigos e uma patente. Cada um destes capítulos apresenta um objetivo específico necessário para alcançar o objetivo geral desta tese. Para cada etapa e para cada objetivo a ser alcançado, utilizou-se um conjunto de metodologias experimentais específicas. A estrutura do trabalho, com os artigos, seus objetivos e métodos, é apresentada na Figura 3.

Estudos	Objetivos	Questões de Pesquisa	Objeto de estudo	Metodologia
Artigo 1 (*)	Sintetizar as evidências disponíveis, e fornecer uma visão geral do estado atual da quimioprevenção da leucoplasia bucal	Quais os agentes quimiopreventivos utilizados para a quimioprevenção da leucoplasia bucal?	1.Séries de casos 2. Ensaio clínicos 3. Ensaios clínicos randomizados	<i>Pesquisa teórica qualitativa</i> Análise de conteúdo de artigos científicos visando contribuir de forma atualizada e abrangente com a literatura científica
Artigo 2 (*)	Revisar de forma abrangente artigos científicos publicados na literatura que utilizaram imiquimode para tratamentos de lesões que acometem a mucosa oral.	O imiquimode tem sido utilizado em doenças que acometem a mucosa oral? De que maneira o fármaco interage com essas doenças a nível biológico?	1.Casos clínicos e séries de casos 2.Desordens potencialmente malignas 3. Neoplasia 4. Doenças virais 5. Doenças autoimunes	<i>Pesquisa teórica qualitativa</i> Análise de conteúdo de artigos científicos visando contribuir de forma atualizada e abrangente com a literatura científica
Patente (*)	Proteger a inovação proposta neste estudo e descrever o processo de desenvolvimento e caracterização do biofilme.	O biofilme proposto é inédito? A nanotecnologia contribuiu para melhor desempenho do biofilme? O biofilme proposto é capaz de gerar danos?	1.Artigos científicos 2. Patentes 3. Desenvolvimento e caracterização do Biofilme (<i>in vitro</i>) 4. Estudo <i>ex vivo</i> 5. Estudo <i>in vivo</i>	<i>Pesquisa teórica qualitativa</i> <i>Estudo experimental in vitro, ex vivo</i>
Artigo 3 (*)	Avaliar a eficácia do biofilme nanotecnológico contendo imiquimode 5% como agente quimiopreventivo em estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	O biofilme contendo imiquimode 5% é citotóxico a células tumorais e não-tumorais? O biofilme inovador possui potencial quimiopreventivo?	1. Análise <i>in vitro</i> do biofilme em diferentes tipos de células tumorais e não-tumorais 2. Estudo <i>in vivo</i> em modelo animal de carcinogênese bucal	<i>Estudo experimental in vitro:</i> Ensaio de Sulforhodamine B (SRB) <i>Estudo experimental in vivo:</i> Indução da carcinogênese Protocolo de quimioprevenção Avaliação clínica e histológica
Artigo 4 (*)	Avaliar a eficácia do hidrogel de quitosana contendo imiquimode 0.05% nanoencapsulado como agente quimiopreventivo em estudo <i>in vivo</i> .	O hidrogel de quitosana contendo imiquimode 0.05% nanoencapsulado possui potencial quimiopreventivo?	Análise <i>in vivo</i> em modelo animal de carcinogênese bucal	<i>Estudo experimental in vivo:</i> Indução da carcinogênese Protocolo de quimioprevenção Avaliação clínica e histológica

Figura 3. Estrutura da tese (*) Artigo publicado (**) Artigo Submetido (***) Artigos que serão submetidos

CAPÍTULO 1

Este capítulo tem como objetivo fornecer uma análise abrangente e atualizada do estado da arte em relação à quimioprevenção e à utilização de fármacos quimiopreventivos na leucoplasia bucal, uma das desordens potencialmente malignas mais prevalentes. Para atingir esse objetivo, foi realizada uma pesquisa de artigos científicos em bases de dados relevantes, sendo selecionados estudos em humanos, principalmente ensaios clínicos, que investigavam o uso de quimiopreventivos tópicos ou sistêmicos para prevenir a progressão da leucoplasia bucal. Ao sintetizar as evidências disponíveis, fornecemos uma visão geral do estado da arte da quimioprevenção na leucoplasia bucal, identificando possíveis lacunas na literatura e orientando pesquisas futuras para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas eficazes e seguras para o câncer bucal. Os resultados e conclusões deste estudo foram publicados no artigo 1 na revista *Frontiers in Oral Health*.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Rogelio González-González,
Juárez University of the State of Durango,
Mexico

REVIEWED BY
Felipe Silveira,
University of the Republic, Uruguay
Vanessa Pereira Prado,
Universidad de la República, Uruguay

*CORRESPONDENCE
Fernanda Visioli
✉ fernanda.visioli@ufrgs.br

RECEIVED 22 March 2023
ACCEPTED 10 May 2023
PUBLISHED 24 May 2023

CITATION
Palma VGM, Koerich Laureano N, Frank LA,
Rados PV and Visioli F (2023) Chemoprevention
in oral leukoplakia: challenges and current
landscape.
Front. Oral Health 4:1191347.
doi: 10.3389/froh.2023.1191347

COPYRIGHT
© 2023 Palma, Koerich Laureano, Frank, Rados
and Visioli. This is an open-access article
distributed under the terms of the Creative
Commons Attribution License (CC BY). The use,
distribution or reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s) and
the copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Chemoprevention in oral leukoplakia: challenges and current landscape

Victor de Mello Palma¹, Natalia Koerich Laureano¹, Luiza Abrahão Frank², Pantelis Varvaki Rados¹ and Fernanda Visioli^{1,3*}

¹Oral Medicine Department, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ³Experimental Center Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Oral potentially malignant disorders have the potential to transform into oral cancer. Oral leukoplakia is a prevalent OPMD with a 9.8% malignant transformation rate. The standard management for OL involves surgical excision, but its efficacy in preventing clinical recurrence and malignant transformation is limited. Therefore, alternative strategies such as chemoprevention modalities have emerged as a promising approach to inhibit the carcinogenesis process. The aim of this review was to identify human studies that investigated the effectiveness of chemopreventive agents in preventing the progression of oral leukoplakia and to provide guidance for future research. Several systemic and topical agents have been evaluated for their potential chemopreventive effects in oral leukoplakia. Systemic agents that have been investigated include vitamin A, lycopene, celecoxib, green tea extract, ZengShengPing, Bowman Birk inhibitor, beta-carotene, curcumin, erlotinib, and metformin. In addition, topical agents tested include bleomycin, isotretinoin, ONYX-015 mouthwash, ketorolac, and dried black raspberry. Despite numerous agents that have already been tested, evidence supporting their effectiveness is limited. To improve the search for an ideal chemopreventive agent for oral leukoplakia, we propose several strategies that can be implemented. Oral leukoplakia chemoprevention presents a promising opportunity for decreasing the incidence of oral cancer. Identifying new chemopreventive agents and biomarkers for predicting treatment response should be a focus of future research.

KEYWORDS

chemoprevention, oral cancer, potentially malignant disorders, leukoplakia, secondary prevention

1. Introduction

Oral potentially malignant disorders (OPMD) are characterized by tissue changes that are more likely to transform into oral cancer than normal tissues (1). Oral cancer refers to a group of malignant neoplasms that affect the oral mucosa, and it represents a significant public health concern worldwide (2). The most common type of oral cancer is the oral squamous cell carcinoma (OSCC), which accounts for over 90% of malignant tumors in the oral cavity (3).

Although OPMD are not always precursors of oral cancer, it is estimated that 7% of SCCs are preceded by this type of lesions (4). However, this data might have been underestimated due to underdiagnosis of OPMDs. Oral leukoplakia (OL) is one of the most prevalent OPMD (5), for which there is currently no effective therapeutic approach to prevent its progression to cancer. OL is defined as "A predominantly white plaque of

questionable risk having excluded (other) known diseases or disorders that carry no increased risk for cancer" (6).

The malignant transformation (MT) rate is 9.8%, with a mean transformation length of 3.2 years (range: 1.8–5.1 years) (5). When presenting epithelial dysplasia, this rate increases to 15.3% (7). The OL patient's profile with higher risk for MT is: female gender, non-smokers, long duration of leukoplakia, location on the tongue and/or floor of the mouth, size >200 mm², non-homogeneous type, presence of epithelial dysplasia, and DNA aneuploidy (8).

The standard management of leukoplakia is surgical excision, and follow-up is guided by histological diagnosis: 6-month intervals for OL without epithelial dysplasia and 3-month intervals for OL with epithelial dysplasia. However, this approach has shown limited efficacy in preventing clinical recurrence and MT. The question that remains is whether this follow-up should be lifelong (9).

Other therapeutic modalities, such as cryosurgery, laser surgery (10), topical or systemic retinoids (11, 12), adenovirus-containing mouthwash (13), and photodynamic therapy (14), have been tested. While there is no clear scientific evidence supporting the effectiveness of these modalities in preventing OL MT (15), healthcare professionals consider treating leukoplakia a safe practice (9, 16) regardless of histological changes, as it is an attempt to prevent MT.

Different chemopreventive agents have been tested in several studies as an alternative treatment to prevent leukoplakia MT. However, the efficacy of these agents remains limited as all chemoprevention trials conducted so far have shown limited success (17, 18). Despite over three decades of research on chemoprevention of oral cancer, a pharmacological strategy that can be deemed as a standard of care has not yet been established (19).

This review aims to identify human studies that examined the effectiveness of chemopreventive agents in preventing OL progression. By synthesizing the available evidence, an overview of the current state of OL chemoprevention is provided, which can help identify gaps in the literature and guide future research to develop effective and safe chemopreventive strategies for oral cancer.

2. Concepts in chemoprevention

The emergence of chemoprevention for OSCC was based on the failure of conventional therapies for definitive control of OPMD. Chemoprevention denotes the application of either natural or synthetic chemical agents, applied topically or systemically, which are used to preclude the advancement or genesis of oral cancer (20, 21).

Chemoprevention is a promising method to reduce oral cancer incidence and mortality rates, especially in high-risk populations. Chemoprevention can restrain the development of cancer by acting on various stages of carcinogenesis. At the initiation, it can block DNA damage, whereas at the tumor promotion and progression stages, it can reverse or suppress the proliferation of premalignant cells (22, 23). Thus, chemoprevention can be formulated to either inhibit, halt, or reverse these processes (24).

From a conceptual perspective, chemoprevention can be categorized as primary, secondary, and tertiary. Primary

chemoprevention focuses on healthy individuals with a high probability of developing cancer. Secondary chemoprevention targets individuals with established premalignancy, such as OPMD. Tertiary chemoprevention aims to prevent recurrence or the emergence of secondary tumors in individuals who have been previously diagnosed and treated cancer (25). This review will focus on the role of secondary chemoprevention in preventing OL progression, relapse, and its MT.

A search was conducted in the PubMed database using the strategy "oral leukoplakia AND chemoprevention", with filters applied for Clinical Trial and Randomized Controlled Trial. A total of 37 articles were retrieved. Inclusion criteria were limited to human studies and articles published in English. Since this is a mini review, only the most relevant studies of each chemoprevention agent were selected (recency, higher sample size, follow-up period). However, a manual search of the references cited in these articles was conducted to identify relevant older and classic studies to provide a more comprehensive overview of the topic. Finally, a total of 19 articles were included in this mini review.

3. Current landscape in chemoprevention of oral cancer

3.1. Systemic chemoprevention

Systemic chemoprevention refers to the use of agents that are given orally or intravenously (22). The goal is to reduce the risk of oral cancer by targeting molecular pathways involved in carcinogenesis, including those regulating cell proliferation, cell cycle, apoptosis, angiogenesis, and inflammation (26).

The main studies in this subject are available at [Table 1](#). Among the systemic chemopreventive agents used are vitamin A (27), lycopene (28), celecoxib (29), green tea extract (30), zengshengping (31), bowman-birk (32), beta-carotene (33), curcumin (34), erlotinib (35), and metformin (36). All of these studies (100%) were randomized controlled trials (RCTs). The sample sizes ranged from 23 to 223 participants. The primary clinical response, which aimed to reduce or eliminate the lesions, was the most frequently assessed outcome, reported in 90% of the trials, although only four studies observed a statistically significant benefit for this outcome (27, 28, 31, 34). Histological analysis was the second most reported outcome, mentioned in 60% of the studies, however most of the studies did not show improvement in this outcome. In addition, 40% evaluated protein or molecular biomarkers. Adverse effects were reported in 60% of the studies. The follow-up time varied from 12 weeks to 5 years.

Considering clinical and histological outcomes, only one systemic chemopreventive agent study demonstrated superiority over placebo. Singh et al. (28) conducted an RCT investigating the effects of lycopene on OL, with participants receiving either 8 mg or 4 mg capsules for 3 months (28). A dose-dependent clinical and histological improvement was detected. Lycopene appears to be a promising antioxidant for treating OL by protecting cells against damage and preventing the progression of

TABLE 1 Studies that employed systemic chemoprevention agents to treat oral leukoplakia.

Reference/design study	Chemopreventive protocol/sample (n)	Outcomes/biomarkers	Main results	Side effects	Follow-up
Stich et al., (27) RCT	Vitamin A capsules (200,000 IU/week) (n=21) Placebo (n=33) 2x week for 6 months	Clinical and histological	CR: Vitamin A 57.1% Placebo 3% (p<0.001) HR: 85% showed thinning of the spinous layer	None	6 months
Singh et al., (28) RCT	A-Lycopene 8 mg/day (n=20) B-Lycopene 4 mg/day (n=20) C-placebo (n=18) 1x day for 3 months	Clinical and histological	CR: (A) 80% (p<0.001) (B) 66.25% (p<0.001) (C) 12.5% HR: (A-B) (p<0.05) (B-C) (p<0.05) (A-C) (p<0.001)	None	2 months
Papadimitrakopoulou et al., (29) RCT	Celecoxib 100 mg (n=17) Celecoxib 200 mg (n=15) Placebo (n=18) 2x day for 12 weeks	Clinical, histological Protein biomarkers: COX-2	CR: placebo 33.3% Celecoxib 100 mg 41.2% Celecoxib 200 mg 20% (p=1.0) HR: placebo 20% Celecoxib 100/200 mg 2.8% (p=0.71) COX-2 (p=0.046)	Dizziness, diarrhea, abdominal pain, oral pain, flatulence, nausea, headache, stomatitis, and sore throat	12 weeks
Tsilo et al., (30) RCT	Green tea extract (GTE) 500 mg (n=11) 750 mg (n=9) 1 g (n=10) Placebo (n=11) 3x day for 12 weeks	Clinical, histological, Protein biomarkers: VEGF, p53, p16, Ki67 and CD44	CR: placebo 18.2% GTE 50% (p=0.09) HR: placebo 91% GTE 21.4% (p=0.68) VEGF (p=0.04) p53 (p=0.004)	Insomnia, headache, nausea, and nervousness	27.5 months
Sun et al., (31) RCT	ZengShengPing (ZSP) 4 tablets 0.3 g (n=59) Placebo (n=53) 3x day for 8–12 months	Clinical, Protein biomarkers: PCNA and Agor	CR: placebo 17% ZSP 67.8% (p<0.01) PCNA-labeling index (p<0.05) Agor (p<0.05)	Not reported	3 months
Armutoglu et al., (32) RCT	Bowman-birk (BBIC) 30 ⁶ CI ₂ units (n=67) Placebo (n=65) 2x day for 6 months	Clinical and histological Protein biomarkers: neu	CR: placebo 30% BBIC 28% (p<0.81) HR: no difference (p>0.88)	None	6 months
Naglo et al., (33) RCT	Beta-carotene (B) 10 mg + Vitamin C (VC) 500 mg (n=23) Control Vitamin C 500 mg (n=23) 1x day for 1 year	Clinical and risk for malignant transformation	CR: control 4.3% B + VC 17.4% (p=0.246) RMT: 0.77 (p=0.588)	None	60 months
Kurukou et al., (34) RCT	Curcumin 36 g (n=111) Placebo (n=112) 1x day for 6 months	Clinical and histological	CR: placebo 55.3% Curcumin 67.5% (p=0.03) HR: placebo 20.7% Curcumin 22.5% (p=0.71)	Anemia, skin/subcutaneous tissue disorders and hypertension	12 months
William et al., (35) RCT	Efotensib 150 mg (n=75) Placebo (n=75) 1x day for 12 months	Oral cancer free survival (OFS), Protein biomarkers: EGFR, Molecular biomarkers: LOH	OFS: placebo 74% Efotensib 70% (p=0.45) OFS/LOH (+) 74% OFS/LOH (-) 87% (p=0.01)	Diarrhea, fatigue and macositis	35 months
Gutkind et al., (36) CT	Single arm: Metformin (500 mg for 1 week, 1,000 mg for 1 week and 2,000 mg for 10 weeks) 1x day	Clinical, histological, Protein biomarkers: mTOR, Ki67, p53, p16, p6, Molecular biomarkers: EGFR, OCT3, TP53, KRAS, NOTCH1, CDKN2A, JNK3A, CASP8	CR: 17% HR: 60%	Gastrointestinal pain and discomfort, abdominal pain, bloating, dyspepsia, pain, and stomach pain	3 months

dysplasia. However, a short two-month follow-up was reported, making it unclear if a long-term effect can be achieved.

Taking into consideration only the clinical outcome, some chemopreventive agents have shown promise as they were superior to placebo: vitamin A resulted in a complete remission rate of 57.1% of OL without side effects (27); ZengShengPing (ZSP) extract showed a positive clinical response in 67.8% of patients, with lesion size decreasing by over 50% after three months of treatment (31); and curcumin improved clinical outcomes in 67.5% of lesions in a RCT, however, side effects such as anemia, skin/subcutaneous tissue disorders, and hypertension were reported (34).

The combination of beta-carotene and vitamin C did not show significant clinical superiority when compared to placebo. Notably, this study also assessed the risk of MT of OL over a 5-year follow-up period (33). The Bowman Birk Inhibitor concentrate (BBIC), also did not result in any significant difference between the placebo and treatment arms regarding clinical response and histological grade or the levels of neu protein, which were assessed as a treatment response biomarker (32).

In recent years, there has been a growing interest in using biomarkers as a tool to improve the efficacy of response detection. These markers can provide valuable information about

the biological processes underlying the development of cancer, allowing researchers to identify higher-risk individuals and monitor the response to chemopreventive interventions (37).

First, protein biomarkers were included as secondary outcomes, to investigate both the treatment's efficacy as well as their potential to predict the evolution of the OL. In a randomized phase II pilot study, Papadimitrakopoulou et al. (29) demonstrated that doses of COX-2 inhibitor (celecoxib 100 and 200 mg twice daily) were ineffective regarding clinical and histological outcomes. However, COX-2 expression was found to correlate with OL progression (29). Tsao et al. (30) investigated the expression of VEGF, p53, p16, Ki67, and CD1 after administering green tea extract (GTE). The clinical and histological response rate was higher after GTE in a dose-response effect, but without statistical significance and with insomnia/nervousness reported as side effects (30).

More recently, molecular biomarkers were also incorporated. William et al. (35) in a RCT testing erlotinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, validated loss of heterozygosity (LOH) as a risk marker for OL MT and its association with an increased number of EGFR (epidermal growth factor receptor) copies. However, erlotinib did not improve cancer-free survival in high-risk patients with LOH-positive OL or with a high number of EGFR copies (35). Guzik et al. (36) conducted a phase IIa clinical trial in individuals with OL and oral erythroplakia to evaluate metformin's potential to target PI3K/mTOR signaling for MT prevention. The histological response, as well as saliva and blood sample collection, protein expression, and exome sequencing were assessed for outcome analysis. After 12 weeks of metformin treatment, 17% of clinical and 60% of histologic response were observed. Pathogenic mutations, compatible with those found in HPV negative HNSCC, were detected. However, none of the mutated genes were significantly associated with the metformin treatment response (36).

3.2. Topical chemoprevention

Site-directed chemoprevention is an alternative for managing OL since it is a low-risk and non-invasive strategy. Topical therapies have advantages, such as reducing the toxicity of chemical agents, and can be applied beyond the clinical margins of the lesions to decrease or even eliminate the risk of relapses (38).

Among the topical chemopreventive agents used are bleomycin (39, 40), isotretinoin (41–43), ONYX-015 (adenovirus) (13), ketorolac (cyclooxygenase inhibitor) (44), and dried black raspberries (45) (Table 2). Of the studies included in this review that used topical chemopreventive agents for OL, only 38% were RCTs. The sample sizes ranged from 10 to 57 participants. The primary clinical response was the most frequently assessed outcome (88%), although only two studies observed statistical significant benefit for this outcome (40, 45), followed by histological responses (63%), where only one study showed statistical difference (45). Additionally, 50% of the studies included the evaluation of protein or molecular biomarkers. Adverse effects were reported in 62% of the studies. The follow-up time varied from 3 months to 10 years.

Two studies evaluated the effect of topical bleomycin on OL using different concentrations for 2 weeks. Wong et al. (39) observed that only two out of five cases treated with bleomycin 0.5% showed partial clinical response, and there was no histological improvement. When a higher dose of 1% was tested, three out of seven achieved complete clinical and histological regression, indicating a dose-dependent relation (39). In the RCT by Epstein et al. (40), bleomycin 1% was superior to placebo only regarding clinical response, and not for the histological outcome (40).

Two trials evaluated the effect of topical isotretinoin 0.1% applied three times a day for four months (41, 42). One study observed complete clinical regression in 10% of the lesions (41), while the investigation by Tetè et al. (42) observed three complete clinical regressions (42). Both studies detected a statistical increase of apoptotic bodies, but no difference for bcl-2 expression. Scardina et al. (43) observed complete clinical regression in 85% of lesions after treatment with isotretinoin gel 0.18% twice a day for two months. After a follow-up period of 10 years, the study found no cases of MT (43).

Rudin et al. (13) evaluated a mouthwash with ONYX-015, an adenovirus vector targeting p53-mutant cells. Histological resolution was achieved in 37% of patients, correlating with decreased p53 positivity over time. No significant changes regarding cyclin D1 or Ki-67 expression were found, suggesting that these are not predictive of response to ONYX-015 (13). In an RCT conducted by Mulshine et al. (44) the efficacy of chemoprevention of oropharyngeal leukoplakia using a rinse solution containing 0.1% Ketorolac, a cyclooxygenase inhibitor, was evaluated. Ketorolac was administered twice a day for 33 days, but clinical and histological outcomes did not demonstrate efficacy compared to placebo (44). Mallery et al. (45) evaluated a bioadhesive gel containing 10% freeze-dried black raspberry (BRB) for three months. The results showed significant clinical regression of the lesions and reduced histological grades and LOH events without side effects (45). The bioadhesive gel containing BRB appears to be a promising topical chemopreventive strategy.

4. Discussion

4.1. The challenges of oral leukoplakia chemoprevention

There is very little research exploring the potential of chemoprevention of oral cancer, and many of the studies available present significant methodological issues. An important highlight is that many of these studies are not RCTs. Consequently, there is a risk of biases in both patient selection and outcome assessment. Furthermore, the sample sizes in numerous studies are insufficient, challenging the establishment of conclusive findings (13, 41, 42).

There are no standards regarding outcome assessment in this field. While most studies have assessed clinical and/or histological resolution, it should be noted that these analyses may not necessarily indicate a significant impact on the carcinogenesis process. When performing histological analysis, epithelial dysplasia

TABLE 2 Studies that employed topical chemoprevention agents to treat oral leukoplakia.

Reference/design study	Chemopreventive protocol/sample (n)	Outcomes/biomarkers	Main results	Side effects	Follow-up
Wong et al., (39) CT	Bleomycin 0.5% (n = 5) Bleomycin 1% (n = 7) 1x day for 2 weeks	Clinical and histological	CR: 1% - 3 cases complete 0.5% - 2 cases partial HR: 0.5% - no improvement 1% - 3 cases complete	Burning, irritation, and erosion	23 months
Epstein et al., (40) RCT	Bleomycin 1% (n = 10) Fluorocin (n = 12) 1x day for 2 weeks	Clinical and histological	CR: Bleomycin 50% Fluorocin 8.3% (p = 0.001) HR: Bleomycin 60% Fluorocin 16.6% (p = 0.094)	Burning, pain, erythema with erosion	22 months
Patelli et al., (41) CT	Isotretinoin 0.1% gel (n = 6) Fluorocin (n = 3) 3x day for 4 months	Clinical Protein biomarker: bcl-2 and Apoptotic analysis	CR: 10% bcl-2 (p = 0.134) Apoptotic bodies (p = 0.0193)	None	4 months
Yeh et al., (42) CT	Isotretinoin 0.1% gel Fluorocin (n = 15) 3x day for 4 months	Clinical Protein biomarker: bcl-2 and Apoptotic analysis	CR: 3 cases bcl-2 (p = 0.132) Apoptotic bodies (p = 0.0193)	Not reported	Not reported
Rudin et al., (13) CS	Mouthwash ONYX-015 for p53-mutant cells 1 Cohort: 12 cycles (daily for 5 days) intervals 4 weeks (n = 7) 2 Cohort: 1x week for 24 weeks (n = 12) 3 Cohort: 5days+ 1x week for 5 weeks (n = 3)	Histological Protein biomarker: p53, Ki67 and cyclin D1	HR: 37% p53 (p = 0.027)	Stomatitis, diarrhea, fatigue, pain, fever, flu symptoms, dysphagia, vertigo, and infection	30 months
Muldine et al., (44) RCT	Ketorolac emul solution 0.1% 10 ml (n = 30) Fluorocin (n = 19) 2x day for 33 days	Clinical and histological	CR: Ketorolac 10.8% Fluorocin 5.2% (p = 0.88) HR: Ketorolac (p = 0.76) Fluorocin (p = 0.80)	Pain (n = 1)	3 months
Scandina et al., (45) CT	Isotretinoin 0.1% gel (n = 40) 2x day for 3 months	Clinical	CR: 85%	Transient erythema and xeroderma	120 months
Maloney et al., (46) RCT	Detail black raphestem (DBR) 10% gel (n = 21) Fluorocin (n = 19) for 3 months	Clinical, histological Molecular biomarkers: LOH	CR: DBR 76% (p = 0.0019) Fluorocin 10% (p = 0.0395) HR: DBR 40.9% (p = 0.0488) Fluorocin 38.9% (p = 0.4961) LOH: DBR 45.5% (p = 0.0002) Fluorocin 38.9% (p = 0.1602)	None	3 months

CS, case series; CT, clinical trial; RCT, randomized clinical trial; CT, clinical trial; CR, clinical response; HR, histological response; LOH, loss of heterozygosity.

severity is usually assessed. However, this assessment is subject to significant intra- and inter-subjectivity, which is still considered a major issue among pathologists (46). To improve the consistency and reliability of diagnoses, it is advisable to incorporate a binary classification system like the one suggested by Kujan et al. (47) in addition to the conventional WHO system (47). It can reduce confusion and enhance uniformity in the interpretation of findings. Recent studies have included molecular analysis as an outcome measure (35, 36, 45), leading to more effective results. Thus, the main mutations linked to oral carcinogenesis can be assessed, and the risk of cancer development can be better predicted. With the next-generation sequencing approach becoming more readily available, its use will unveil the effects of chemopreventive agents at the molecular level. Consequently, it will allow accurate monitoring of alterations in primary oncogenic mutations or epigenetic modifications (48–50).

Nevertheless, regarding leukoplakia chemoprevention, the ideal outcome is cancer-free survival, which requires a long follow-up and a large sample size. In this sense, multicenter studies are desirable as they can gather a higher number of patients. Moreover, multicenter studies are advantageous as they increase

sample heterogeneity and enable the analysis of the efficacy of chemopreventive agents in different populations (36).

Currently, there are limited chemopreventive options available for OL and those that have been evaluated frequently result in significant side effects. Systemic agents offer the advantage of a more widespread effect, which is especially relevant considering the existence of a cancerization field in the oral cavity. This means that altered cells can be found beyond clinically visible lesions (51). Nevertheless, it is essential to note that systemic drugs carry a higher risk of toxicity and side effects, including gastrointestinal symptoms, liver toxicity, increased risk of bleeding, among others. As such, it is crucial to carefully monitor individuals receiving chemopreventive agents for any adverse effects and adjust the dosage or discontinue the agent if necessary. These undesirable effects may be more relevant for patients with comorbidities or who are taking other medications regularly. Therefore, the cost-benefit ratio must be individually assessed.

Topical agents, on the other hand, present a lower risk of significant side effects since they act locally. However, delivering a substance to the oral mucosa has additional challenges. Firstly,

some lesions may be located in subsites that are difficult to reach. Secondly, due to the salivary flow, the residence time of drugs in conventional formulations is reduced, potentially decreasing their effectiveness. Therefore, the development of mucoadhesive delivery systems is necessary to achieve better results.

When considering a potential chemoprevention agent, it is essential to also consider their long-term safety since prevention may require longer periods of treatment (31, 33, 35). This is particularly important as prolonged exposure may lead to unexpected adverse effects or toxicity. Moreover, it is important to note that resistance to chemopreventive agents can develop over time, making them less effective.

Considering the criteria of response to treatment, follow-up time, and severity of side effects from studies included in this review, it can be suggested that among systemic chemopreventives, lycopene (28) and green tea extract (GTE) (30) appear to be promising. Both 8 mg and 4 mg lycopene capsules caused histological response, without side effects, although the follow-up time was short, only 2 months. GTE also showed a histological improvement, the side effects reported were mild and a long follow-up period of 27.5 months was reported. Among topical chemopreventives, the application of 10% dried black raspberries (BRB) bioadhesive gel (45) seems promising, showing a histological improvement of lesions and no adverse effects, although the follow-up time was only 3 months. However, it is important to note that these chemopreventive agents were evaluated in a limited number of studies, and additional studies with larger samples and longer follow-up times are needed to confirm these findings.

Even after addressing all the issues raised so far, there are still several challenges associated with implementing chemoprevention for OL on a large scale. Firstly, there is poor awareness about the benefits of chemoprevention and the risk factors for OL, which can result in low participation rates. Early detection of OL remains a challenge, hindering effective implementation of chemoprevention strategies. Additionally, chemoprevention can be expensive and may not be covered by insurance, making it unaffordable to many patients. Nevertheless, healthcare systems and their administrators should consider that the treatment for oral cancer would be much more expensive than its chemoprevention, thus justifying the implementation of these strategies. This highlights the importance of raising awareness of the benefits of chemoprevention and making it more accessible to those who need it, ultimately leading to a decrease in the incidence and burden of oral cancer.

4.2. What can we improve in the search for an ideal chemopreventive for oral leukoplakia?

To improve the search for an ideal chemopreventive for treating OL, several strategies can be employed. Firstly,

there is a need for a better understanding of the molecular mechanisms involved in oral carcinogenesis to identify the most potential targets for chemoprevention. Secondly, it is crucial to focus on developing safe and effective chemopreventive agents with minimal side effects. Thirdly, there is a need for more standardized RCTs to evaluate the efficacy and safety of potential chemopreventive agents. The future studies on this subject should focus on the identification and selection of high-risk individuals, based on their profile, the subsite of the lesion, use of carcinogenic agents, and especially molecular markers such as LOH and mutations in the main pathways of oral carcinogenesis (35, 36, 52). Also, there should be efforts to increase public awareness about the benefits of chemoprevention and risk factors for oral cancer to increase participation rates. This can be achieved through education and awareness campaigns, targeted screening programs, and community outreach programs. A greater collaboration among researchers, clinicians, policymakers, and other stakeholders is also necessary to implement effective chemoprevention programs at the population level. This may involve various measures such as creating national guidelines for oral cancer screening and prevention, integrating chemoprevention into existing cancer prevention and control programs, and promoting public-private partnerships to facilitate research and development of new chemopreventive agents.

5. Conclusion

In summary, OL chemoprevention presents a promising strategy to reduce the incidence of oral cancer in high-risk individuals. Investigating chemopreventive agents that target molecular pathways implicated in cancer development and progression in clinical trials is crucial. Careful patient selection and monitoring for potential side effects are necessary for the safe and efficient implementation of chemopreventive agents. Furthermore, identifying novel chemopreventive agents and biomarkers for predicting treatment response should be a priority of future research.

Author contributions

VP, NK, and FV: prepared the manuscript. LF and PR: reviewed, edited, and assisted in the preparation of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil, scholarship grant). CNPq (Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico, process number 407585/2021-4 and 151029/2022-9) FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, process number 21/2551-000/065-2)

Acknowledgments

We are thankful to CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. This research was carried out in the framework of the National Institute of Science and Technology in Pharmaceutical Nanotechnology: a transdisciplinary approach INCT-NANOFARMA, which is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) Grant #2014/50928-2, and by "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq, Brazil) Grant #465687/2014-8.

References

1. Wimalakumara S, Kujan O, Aguiar-Urizar JM, Bugan JV, González-Molina MA, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: a consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO collaborating center for oral cancer. *Oral Dis.* (2021) 27:1862–80. doi: 10.1111/odi.13704
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* (2021) 71:209–49. doi: 10.3322/caac.21660
3. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sroog PJ. *WHO Classification of Tumors of the Head and Neck*. Lyon: IARC (2017). 203–60.
4. Yank EL, Karki HA, Silverberg MJ, Mann MM, Engels EA, Chaturvedi AK. Leukoplakia, oral cavity cancer risk, and cancer survival in the U.S. elderly. *Cancer Prev Res (Phila).* (2015) 8:857–63. doi: 10.1158/1940-6207.CCR-15-0091
5. Aguiar-Urizar JM, Lafuente-Sánchez DM, Wimalakumara S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis.* (2021) 27:1881–95. doi: 10.1111/odi.13810
6. Wimalakumara S, Johnson NW, van der Wal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* (2007) 36:575–80. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x
7. Stojanov IJ, Bin WS. Malignant transformation rate of non - reactive oral hyperkeratosis suggests an early dysplastic phenotype. *Head Neck Pathol* (2022) 16:566–74. doi: 10.1007/s12105-021-01363-z
8. van der Wal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concepts of management. *Oral Oncol.* (2010) 46:423–5. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.02.016
9. van der Wal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* (2010) 46:317–23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016
10. Chaudh A, Smith ACH. The use of CO2 laser in the treatment of oral white patches: outcomes and factors affecting recurrence. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2005) 34:396–400. doi: 10.1016/j.ijom.2004.10.003
11. Chien F, Yndati N, Gregolat R, Bomzoti P, Stigmarik E, Cress N, et al. Randomized trial of fenestrol (4-HPR) to prevent recurrence, new localizations and carcinomas in patients operated on for oral leukoplakia: long-term results. *Int J Cancer.* (2005) 115:625–9. doi: 10.1002/ijc.20923
12. Sood S, Shiff SJ, Yang CS, Chen X. Selection of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs for oral cancer chemoprevention. *Oral Oncol.* (2005) 41:562–7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.01.003
13. Radin CM, Cohen EEW, Papadimitrakopoulou VA, Silverman SJ, Rosent W, El-Naggar AK, et al. An attenuated adenovirus, ONYX-015, as mouthwash therapy for premalignant oral dysplasia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* (2003) 21:4546–52. doi: 10.1200/JCO.2003.03.544
14. Kval SI, Warloe T. Photodynamic treatment of oral lesions. *J Evol Pathol Toxicol Oral.* (2007) 26:127–33. doi: 10.1615/evolvepatholtoxiconcol.v26.i2.70
15. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* (2008) 37:63–9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00575.x

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

16. Yndati N, Gregolat R, Calabrese I, Costa I, Giugliano G, Morilli F, et al. Oral leukoplakias: to treat or not? *Oral Oncol.* (1997) 33:317–21. doi: 10.1016/s1368-8375(97)00016-x
17. Kuzelovec MA, Shuman R. Oral cancer prevention. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* (2006) 18:493–511. doi: 10.1016/j.cma.2006.06.003
18. Xie Y, Liu J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: a systematic review and meta-analysis. *J Pak Med Assoc.* (2017) 67:1415–9. PMID: 28924285
19. Monteiro de Oliveira Neves JA, William WNJr. Prognostic factors, predictive markers and cancer biology: the road for successful oral cancer chemoprevention. *Future Oncol.* (2016) 12:2379–86. doi: 10.2217/fon-2016-0168
20. Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res.* (1976) 36:2699–702. PMID: 1277177
21. Iino Y-H, Chou W-Y, Chang C-W, Lin M-C, Wang C-P, Liu P-J, et al. Chemoprevention of oral cancer: a review and future perspectives. *Head Neck.* (2023) 45:1045–59. doi: 10.1002/hed.27301
22. Swetha MGMS, Kanchana CK, Rajgata TP, Anto R. Cancer chemoprevention: a strategic approach using phytochemicals. *Front Pharmacol.* (2021) 12:809308. doi: 10.3389/fphar.2021.809308
23. Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science.* (1997) 278:1073–7. doi: 10.1126/science.278.5340.1073
24. Chau I, Jabum JJ, Liu W, Swider FF, Warner BM, Lin HS, et al. Topical agents for oral cancer chemoprevention: a systematic review of the literature. *Oral Oncol.* (2017) 67:153–9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.02.014
25. Nathani R, Huma LC, Moriarty RM, McCormick DL, Mehta RG. Comparative review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials. *Curr Med Chem.* (2008) 15:1044–71. doi: 10.2174/092986708784221403
26. Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer.* (2013) 109:1–7. doi: 10.1038/bjc.2013.280
27. Stieh HF, Hornby AJ, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Response of oral leukoplakias to the administration of vitamin A. *Cancer Lett.* (1988) 40:93–101. doi: 10.1016/0304-3835(88)90266-2
28. Singh M, Krishnappa R, Bagewadi A, Katakur V. Efficacy of oral hyposens in the treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* (2004) 40:591–6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2003.12.011
29. Papadimitrakopoulou VA, William WN Jr, Dannenberg A, Ippman SM, Lee JJ, Ondrey FG, et al. Pilot randomized phase II study of celecoxib in oral premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* (2006) 14:2095–101. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4024
30. Yao AS, Liu D, Martin J, Tang X, Lee JJ, El-Naggar AK, et al. Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res.* (2009) 29:31–41. doi: 10.1158/1940-6207.CCR-09-0121
31. Sun Z, Guan X, Li N, Liu X, Chen X. Chemoprevention of oral cancer in animal models, and effect on leukoplakias in human patients with Zengshengping, a mixture of medicinal herbs. *Oral Oncol.* (2010) 46:105–10. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.06.004

32. Armstrong WB, Taylor TH, Kennedy AR, Melrose RJ, Menaldi DV, Gu M, et al. Bosentan histone inhibitor concentrations and oral leukoplakia: a randomized phase IIB trial. *Cancer Prev Res*. (2013) 6:410–8. doi: 10.1158/1940-6207.CCR-13-0004
33. Nagao T, Wamukoiwa S, Nakamura T, Kato S, Yamamoto K, Fukano H, et al. Treatment of oral leukoplakia with a low-dose of beta-carotene and vitamin C supplement: a randomized controlled trial. *Int J Cancer*. (2015) 136:1708–17. doi: 10.1002/ijc.29156
34. Kurlawa MA, Ramdas K, Dey B, Iyer S, Rajan G, Hango KK, et al. A randomized double-blind placebo-controlled phase IIB trial of curcumin in oral leukoplakia. *Cancer Prev Res*. (2016) 9:683–91. doi: 10.1158/1940-6207.CCR-15-0390
35. Wilam WN, Papadimitrakopoulou V, Lee JJ, Mao L, Cohen EEW, Lin HY, et al. Erlotinib and the risk of oral cancer: the erlotinib prevention of oral cancer (EPOC) randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. (2016) 2:209–16. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.4364
36. Gutkind JS, Molino AA, Wu X, Wang Z, Nachman D, Hartemink O, et al. Inhibition of mTOR signaling and clinical activity of mifepristone in oral premalignant lesions. *JCI Insight*. (2021) 6:1–14. doi: 10.1172/jci.insight.147096
37. Fumh CS. Molecular, genomic and mutational landscape of oral leukoplakia. *Oral Dis*. (2021) 27:803–12. doi: 10.1111/odi.13608
38. Swider FF, Warner BM, Schwartz SJ, Gambetti DM, Weinstein JD, Feibley AM. Mucosal therapy for potentially malignant diseases and OSCC. In: Feibley AM, editor. *Targeting oral cancer*. Detroit, MI (USA): Springer C. (2016). p. 263–99. doi: 10.1007/978-3-319-27647-2_12
39. Wong F, Epstein J, Miller A. Treatment of oral leukoplakia with topical bleomycin: A pilot study. *Cancer*. (1989) 64:561–5. doi: 10.1002/1097-0142(198907)5(6)<42<361::aid-cncr2020640203>3.0.co;2-8
40. Epstein JB, Wong FL, Miller A, Le ND. Topical bleomycin treatment of oral leukoplakia: a randomized double-blind clinical trial. *Head Neck*. (1994) 16:539–44. doi: 10.1002/hed.2880160607
41. Piatelli A, Horati M, Santinelli A, Rubini C. bcl-2 expression and apoptotic bodies in 13-cis-retinoic acid (isotretinoin)-topically treated oral leukoplakia: a pilot study. *Oral Oncol*. (1999) 35:314–20. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00095-5
42. Tai S, Pappalardo S, Rubini C, Salini L, Palco A, Perfetti RG. The role of apoptosis and bcl-2 protein in topical treatment of oral leukoplakia with isotretinoin. *Minerva Stomatol*. (1999) 48:411–8. PMID: 10638174
43. Scandola GA, Carini F, Maestri E, Valerini V, Messina P. Evaluation of the clinical and histological effectiveness of isotretinoin in the therapy of oral leukoplakia: ten years of experience in management still up to date and effective? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. (2005) 28:115–9. doi: 10.1358/mf.2006.28.2.977843
44. Mukhine JL, Atkinson JC, Geier RC, Papadimitrakopoulou VA, Van Waa C, Ruzi S, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIB trial of the cyclooxygenase inhibitor lornoxicam as an oral rinse in oropharyngeal leukoplakia. *Clin Cancer Res*. (2004) 10:1565–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1020-3
45. Malley SR, Tong M, Shumway BS, Curran AE, Larsen PE, Noss GM, et al. Topical application of a mucadhesive freeze-dried black raspberry gel induces clinical and histologic regression and reduces loss of heterozygosity events in premalignant oral intraepithelial lesions: results from a multicenter, placebo-controlled clinical trial. *Clin Cancer Res*. (2014) 20:1910–24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3159
46. Spight PM, Ahnen TJ, Hortano PN, Jara R, Visk J, Thornhill MH, et al. Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. (2015) 120:474–82.e2. doi: 10.1016/j.oooo.2015.05.023
47. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. (2006) 42:987–93. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.12.014
48. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: classification and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol*. (2019) 23:19–27. doi: 10.4103/jomfp.jomfp_13_19
49. Wu JJ, Poell JB, Brink A, Ivers I, Emuze ER, de Vries JGAM, et al. Elucidating the genetic landscape of oral leukoplakia to predict malignant transformation. *Clin Cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. (2023) 29:602–13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2210
50. Poell JB, Wu JJ, Brink A, Dietrich R, Krog C, Vellmar E, et al. Oral cancer prediction by noninvasive genetic screening. *Int J Cancer*. (2023) 152:27–38. doi: 10.1002/ijc.34277
51. Mohan M, Jagannathan N. Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncol Rev*. (2014) 8:244. doi: 10.4081/oncol.2014.244
52. Zhang L, Ruzi MP. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. (2001) 30:513–20. doi: 10.1034/j.1600-0714.2001.300901.x

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do ponto de vista científico e humano, é de extrema importância um olhar diferenciado aos pacientes afetados por desordens potencialmente malignas, pois atualmente há limitadas opções de tratamento para essas condições, e muitas vezes, acabamos assistindo o desenvolvimento do câncer. Essa lacuna no direcionamento do tratamento motivou intensamente nosso grupo de pesquisa a se envolver nessa temática e buscar possíveis soluções para esses problemas. Embora ainda haja muito trabalho e reflexões necessárias para colocar em prática nossas propostas, o sentimento de dever cumprido já começa a se manifestar entre todos os membros da equipe. Sabemos que há um longo caminho a percorrer, mas estamos determinados a enfrentar esse desafio e contribuir, de forma significativa, para a melhoria do cuidado desses pacientes através de intervenções seguras e eficazes e que contribuam significativamente na qualidade de vida dos mesmos.

