

# EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO KI67, P53 E TIMIDILATO SINTASE EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS DA MUCOSA LINGUAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS PELO 5-FLUOROURACILA-OROBASE

Eduarda Francayne Lima de Souza<sup>1</sup>; Jurema Freire Lisboa de Castro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Odontologia- CCS – UFPE; E-mail: Eduarda-20@live.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Clínica e Odontologia Preventiva –UFPE. E-mail: jlisboa72@hotmail.com

**Sumário:** O 5-fluoruracila (5-FU), é um análogo da pirimidina que interfere com síntese de timidilato, tem um largo espectro de atividade contra tumores sólidos e percentual de cura maior que 90 por cento em lesões potencialmente malignas de pele. Em cavidade oral, há como prática o tratamento cirúrgico na maioria dos casos, o qual reduz o número de acometimento de pacientes por lesões malignas, não sendo usual o tratamento com quimioterápicos. Esse trabalho objetivou avaliar a efetividade do antineoplásico 5-fluoruracila em orabase em lesões potencialmente malignas da mucosa lingual de camundongos através da expressão dos marcadores biológicos para o Ki67, p53 e timidilato sintase. Camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* foram submetidos ao carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO), 100 µg/ml, na água de beber por 8 semanas e, ao desenvolverem lesões potencialmente malignas em língua, foram diariamente tratados com o 5-FU em orabase topicamente, nas concentrações de 0,5% e 5%, por 4 semanas. Após eutanásia dos animais, as línguas removidas, foram analisados em microscopia de luz. O tratamento com o 5-FU em orabase, na concentração de 0,5%, mostrou uma maior efetividade na involução do grau histológico de acometimento no epitélio da língua dos animais do que a concentração de 5%.

**Palavras-chave:** camundongos; 4-Nitroquinolona-1-Óxido, lesões pré-cancerosas, Fluoruracila.

## INTRODUÇÃO

O 5-Fluoruracila (5-FU) consiste em um antineoplásico que atua diretamente no DNA, tendo seu mecanismo de ação bem estabelecido<sup>1</sup>, já que vem sendo utilizado de forma sistêmica em todo mundo<sup>2</sup> nos canceres de colo retal, pulmão, mama e pâncreas. O mecanismo de ação do 5-FU se dá pela inibição da enzima timidilato sintase (TS), a qual deixa de converter o nucleotídeo desoxiuridina em timidina, reduzindo a síntese de DNA. Já que as células com displasia e neoplasia necessitam de um alto número de DNA em comparação às células normais, o 5-FU atua preferencialmente causando apoptose nas células doentes, preservando as saudáveis<sup>3,4</sup>. Este composto tem mostrado segundo a literatura bons resultados em lesões malignizáveis em pele, porém seu uso na mucosa lingual e oral ainda é pouco disseminado como tratamento para essas lesões<sup>5</sup>. Portanto, esse trabalho tem como proposta mostrar a eficiência do antineoplásico 5-Fluorouracila em lesões malignizáveis de língua e mucosa oral, a partir do experimento em animais, camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento consiste em uma amostra de 72 animais, camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)*. Todos os animais foram doados pelo laboratório LIKA-Laboratório de Imunopatologia KEIZO ASAMI, situado na UFPE. Dentre as práticas laboratoriais

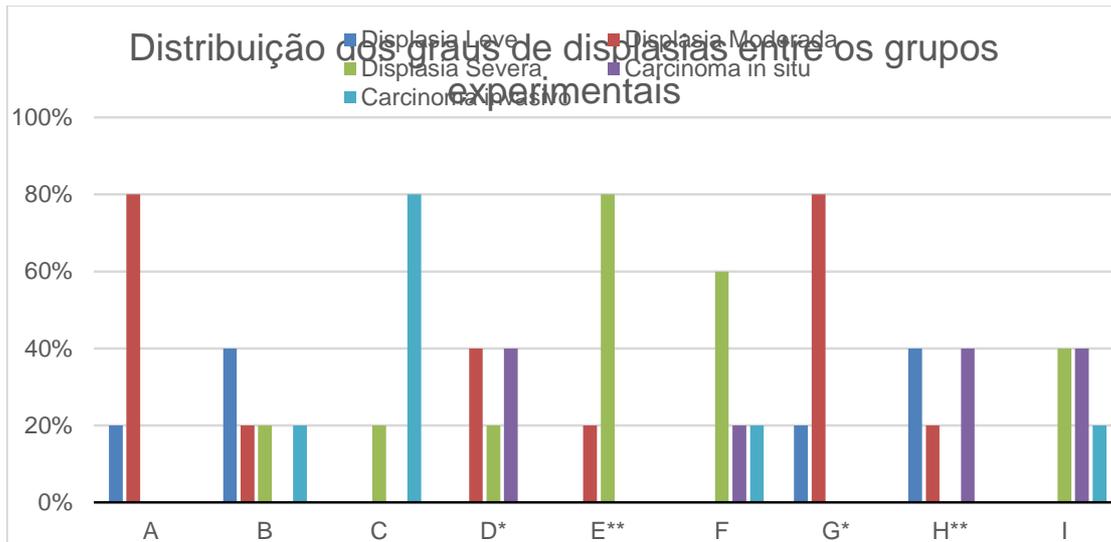
desenvolvidas no biotério do Departamento de Antibióticos de Farmácia, os camundongos foram divididos em nove grupos experimentais com oito animais cada identificados da seguinte forma: doadores saudáveis A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2, D1, D2. Após a divisão em grupo, os animais foram submetidos à carcinogênese por oito semanas com a introdução do 4NQO (4-nitroquinolona-1-óxido) na água de beber com concentração de 100 µg/ml. Para isso utilizou-se uma balança de precisão e água filtrada. Os recipientes foram todos envoltos em papel alumínio para a proteção de luz ambiente. Cerca de 27 animais morreram reorganizando os animais em 9 grupos de 5 animais.

A administração do carcinogênico na água era feita nas sextas-feiras e ficava por um prazo máximo de oito dias onde ocorria a troca da água. Porém, a troca das gaiolas e a administração da *ad libitum* eram realizadas no mesmo dia, duas vezes por semana; terças e sextas. Concluído o prazo de adição do carcinógeno na água, foi retirado o composto 4NQO da água de beber dos camundongos, onde os mesmos voltaram a beber somente água durante quatro semanas. Decorrido este prazo de monitoramento, iniciou-se a aplicação do 5-Fluoruracila em Orabase, nas concentrações de 0,5% e 5%, na mucosa lingual dos animais, além da aplicação somente da Orobace (veículo do fármaco) nos grupo D1 e D2 para posterior análise de dados. Todo o procedimento foi feito de maneira tópica através do auxílio de pincel. Os camundongos foram imobilizados de modo manual com auxílio de uma pinça para tracionar a língua, sem o uso de anestésico. A aplicação começou dia 26 de janeiro deste ano e neste mesmo dia, foi realizado o sacrifício do primeiro grupo de animais. Os animais foram anestesiados através da associação de 100mg/kg de peso corpóreo de cloridrato de quetamina e 10mg/kg de peso corpóreo de xilazina, por via intraperitoneal. Foi realizada a eutanásia, a partir da administração de uma dose excessiva de quetamina, associado à xilazina, o qual foi utilizando o triplo da dose da solução anestésica aplicada anteriormente, por via intraperitoneal. Após, a eutanásia as línguas foram removidas com auxílio de bisturi nº12 e fixadas em solução de Formalina Tamponada 10% por 24h. As peças histológicas foram encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco, onde as lâminas foram analisadas histologicamente.

## RESULTADOS

Dos grupos tratados com o 5-FU, o grupo G (tratado com 5-FU 0,5% por 3 semanas e monitorado por mais 3 semanas) foi o que apresentou menor grau de alteração histopatológica, com presença marcante de displasia moderada, já que os outros grupos tratados com o 5-FU apresentaram algum caso de displasia severa ou carcinoma in situ. (tabela 1)

Tabela-1

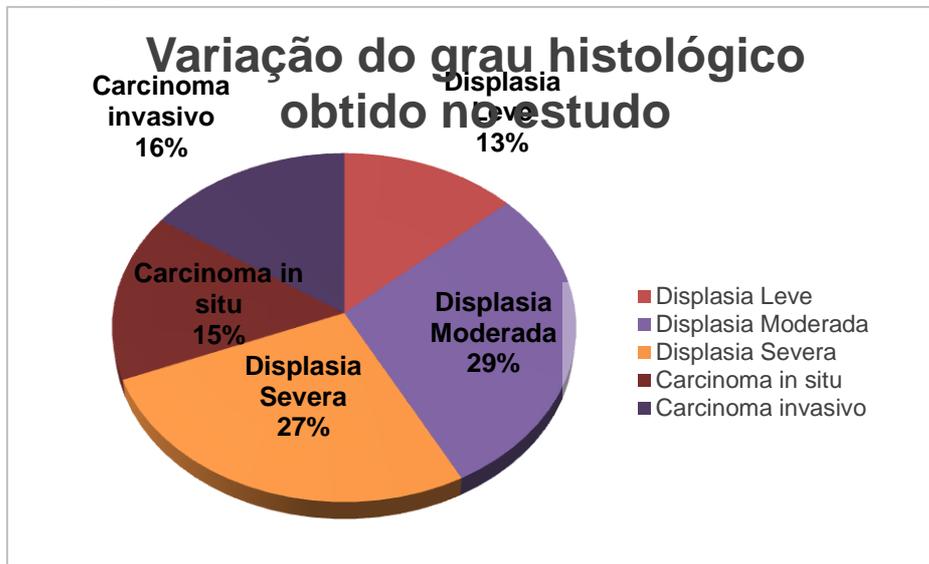


\*Grupo tratado com 5-FU 0,5%; \*\*Grupo tratado com 5-FU 5%.

O grupo G (tratado com 5-FU 0,5%) também foi o que apresentou melhor resultado quanto à involução no grau histológico das lesões, quando comparados ao seu grupo controle C (submetido apenas ao 4NQO) e ao grupo controle I (tratado com orabase e monitorado pós tratamento). ( Tabela-1)

Os grupos G e H, que foram tratados com o 5-FU e monitorados pós-tratamento, mostraram involução no grau histológico das lesões quando comparados ao grupo controle C, já que os animais não tratados chegaram a desenvolver carcinoma invasivo. Já dentre todos os animais tratados com o 5-FU o maior grau histológico observado foi o de carcinoma in situ, com a maioria das lesões de displasia moderada.( Tabela 2)

Tabela-2



## DISCUSSÃO

Pudemos observar neste estudo, que lesões potencialmente malignas da cavidade oral, quando tratadas em estágio inicial de displasia com o 5-Fluoruracila em orabase de modo tópico nas concentrações de 0,5% ou 5%, involuíram de grau histológico. Esse é um resultado satisfatório para tratamento precoce de lesões potencialmente malignas na

cavidade oral, já que até o momento, resultados positivos e bem estabelecidos com o uso tópico do 5-FU são visto na dermatologia, nas lesões potencialmente malignas de pele<sup>6</sup>.

Do ponto de vista preventivo, os resultados obtidos neste estudo mostram-se bastante satisfatórios, já que as lesões potencialmente malignas da cavidade oral podem apresentar predisposição ao câncer de boca<sup>7</sup> e quando tratadas precocemente, possibilitam um melhor prognóstico ao paciente, com maiores chances de cura<sup>8</sup>.

Foi possível observar neste estudo a formação das mais variadas alterações histológicas no tecido epitelial da língua dos animais, como: hiperplasia, displasia epitelial leve, moderada e severa, carcinoma in situ e carcinoma invasivo. Como isso era desejado, o 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO) foi o carcinógeno escolhido, já que o mesmo possibilita a indução de todas as etapas da carcinogênese<sup>9</sup>.

Houve uma tendência ao aumento no grau histológico de severidade das lesões com o passar do tempo após o uso do 4NQO, passando de um maior percentual de displasia moderada, ao grau de carcinoma invasivo, à medida que transcorria o tempo de observação dos animais. Esta ocorrência também foi observada por outros autores que utilizaram este protocolo experimental<sup>9</sup>.

### CONCLUSÕES

A prática cirúrgica como protocolo de tratamento para lesões malignizáveis do epitélio oral, ainda configura-se como a principal forma de tratamento. No entanto a descoberta de novos métodos precoces de diagnóstico, como o uso do 5-Fluorouracil tem aumentado consideravelmente as chances de cura dos pacientes, principalmente em lesões cutâneas. Pois, como o antineoplásico interfere diretamente na molécula de DNA defeituoso, faz com que o tratamento torne se diferenciado e eficaz no combate a neoplasia.

### AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e saúde, aos meus pais que compartilharam comigo todas etapas do projeto, a Dra Gilliene Costa que com paciência e sabedoria soube me ajudar da melhor forma possível e a minha orientadora, Profa Dra Jurema Castro pela maestria sempre admirável e a oportunidade do contato com a pesquisa.

### REFERÊNCIAS

- 1-Brouns, E. R. A., Baart, J. A., Bloemena, E., Karagozoglu, H., & Van der Waal, I. (2013). The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: Definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 18(1), e19.
- 2- Zhang, J., de Toledo, S. M., Pandey, B. N., Guo, G., Pain, D., Li, H., & Azzam, E. I. (2012). Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), E926-E933.
- 3-Visioli, F., Lauxen, I. S., Sant'Ana Filho, M., & Rados, P. V. (2012). Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21WAF1 in different types of non-dysplastic leukoplakias. *Journal of Applied Oral Science*, 20(3), 369-375.
- 4-Hossaka, T. A., Focchi, G. R., Oshima, C. T., & Ribeiro, D. A. (2013). Detection of galectins during malignant transformation of oral cells. *Dental research journal*, 10(4), 428.

5-Smith, J. S., Backes, D. M., Hoots, B. E., Kurman, R. J., & Pimenta, J. M. (2009). Human papillomavirus type-distribution in vulvar and vaginal cancers and their associated precursors. *Obstetrics & Gynecology*, *113*(4), 917-924.

6-Ge, L., Wu, Y., Wu, L. Y., Zhang, L., Xie, B., Zeng, X., ... & Zhou, H. M. (2011). Case report of rapidly progressive proliferative verrucous leukoplakia and a proposal for aetiology in mainland China. *World J Surg Oncol*, *9*, 26.

7-Iwahashi, S., Ishibashi, H., Utsunomiya, T., Morine, Y., Lkhaguva Ochir, T., Hanaoka, J., ... & Shimada, M. (2011). Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines. *The Journal of Medical Investigation*, *58*(1, 2), 106-109.

8-Jaber, M. A. (2010). Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *Journal of oral science*, *52*(1), 13-21.

9- Hasina, R., Martin, L. E., Kasza, K., Jones, C. L., Jalil, A., & Lingen, M. W. (2009). ABT-510 is an effective chemopreventive agent in the mouse 4-nitroquinoline 1-oxide model of oral carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, *2*(4), 385-393.