



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
GILLIENE BATISTA FERREIRA DA COSTA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO Ki 67 EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS DA MUCOSA LINGUAL DE
CAMUNDONGOS TRATADAS PELO 5-FLUORURACILA-
ORABASE**

Recife - PE

2017

GILLIENE BATISTA FERREIRA DA COSTA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO Ki 67 EM LESÕES
POTENCIALMENTE MALIGNAS DA MUCOSA LINGUAL DE
CAMUNDONGOS TRATADAS PELO 5-FLUORURACILA-
ORABASE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro
Coorientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Recife – PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C837e Costa, Gilliene Batista Ferreira da.
Expressão imuno-histoquímica do ki 67 em lesões potencialmente malignas da mucosa lingual de camundongos tratadas pelo 5-fluoruracil / Gilliene Batista Ferreira da Costa. – 2017.
70 f.: il.; 30 cm.
- Orientadora: Jurema Freire Lisboa de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.
1. Carcinogênese. 2. Camundongos. 3. Fluoruracil. 4. Biomarcadores. I. Castro, Jurema Freire Lisboa de (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2017-144)

GILLIENE BATISTA FERREIRA DA COSTA

“EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO KI 67 EM LESÕES POTENCIALMENTE
MALIGNAS DA MUCOSA LINGUAL DE CAMUNDONGOS TRATADAS PELO 5-
FLUORURACILA-ORABASE”

Aprovado em 20 de fevereiro de 2017

Orientadora: Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO

Banca Examinadora:

Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO

(Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. LIRIANE BARATELLA EVENCIO (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. FABIANA MOURA DA MOTTA SILVEIRA (Examinador Externo)

IMIP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

COLEGIADO

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof^a. Dr^a. Andrea Cruz Camara

Prof^a. Dr^a. Andrea dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof^a. Dr^a. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof^a. Dr^a. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

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

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico este trabalho à minha família, que é base e fortaleza para que eu alcance todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus todo poderoso, pelo dom da vida. Agradeço pela saúde que me possibilita alcançar todos os meus objetivos através dos meus esforços.

Aos meus pais, Gilvan Ferreira da Costa Filho e Maria Goretti Batista da Costa, por tudo que tenho e sou. Sou grata pelo incentivo, sem dúvida fundamental, para que eu alcançasse sucesso na minha vida profissional.

À minha irmã, Gilliane Batista Ferreira da Costa, pela companhia permanente e por todo apoio diário. Ela soube me ajudar a tornar tudo mais fácil.

Ao meu marido, Júlio César Araújo de Macêdo, que se fez presente em todos os momentos, e por sempre me incentivar a buscar, acima de tudo, a felicidade.

À minha orientadora, Profa. Jurema Freire Lisboa de Castro, por toda dedicação e ensinamentos. Agradeço por toda confiança.

Ao meu coorientador, Prof. Danyel Elias da Cruz Perez, por todos os ensinamentos passados com tanta paciência, e pela dedicação ao meu trabalho.

Agradeço à Professora Ivone Antônia de Souza, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por abrir para mim as portas do biotério do Departamento de Antibióticos, dedicando-se à minha pesquisa com tanta boa vontade. Agradeço também pela confiança.

Aos meus professores do curso de Pós-graduação em Odontologia – Doutorado – pelos preciosos ensinamentos.

A todos os meus colegas de turma, pelos momentos de convívio, os quais foram repletos de alegria.

Aos meus parentes e familiares por tantas vibrações positivas e pelo apoio incondicional em todas as horas.

À Eduarda Souza, na época aluna de iniciação científica, hoje cirurgiã-dentista, agradeço por toda ajuda, principalmente durante as atividades no biotério.

Ao Laboratório de Patologia Oral do Curso de Odontologia da UFPE, pela contribuição na realização deste trabalho; e ao técnico do laboratório, Sr. Rogério Clericuzi, pela enorme contribuição e participação.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, nas pessoas de Oziclere Sena, Tamires Oliveira e Tânia Maria de Souza, pela convivência diária e ajuda nos momentos de necessidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo financiamento desta pesquisa.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Charles Chaplin

RESUMO

O 5-fluoruracila (5-FU) é um quimioterápico de uso já consolidado no tratamento de lesões potencialmente malignas de pele. No entanto, em cavidade oral, o uso de quimioterápicos de forma tópica para o tratamento de lesões potencialmente malignas ainda não é uma realidade. Um tratamento tópico evitaria o desconforto pós-operatório causado por procedimentos invasivos. Sendo assim, esse trabalho objetivou avaliar a efetividade do antineoplásico 5-fluoruracila em orabase em lesões potencialmente malignas do dorso da mucosa lingual de camundongos, através da expressão do marcador biológico Ki 67. Para isso, camundongos machos albinos *Swiss (Mus musculus)* foram submetidos ao carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO), 100 µg/mL, na água de beber por 8 semanas. Após o período de monitoramento de mais 08 semanas, ao desenvolverem o processo de carcinogênese em língua, foram tratados com 01 aplicação tópica diária de 5-FU em orabase, nas concentrações de 0,5% e 5%, por 3 semanas. Após eutanásia dos animais, as línguas foram removidas, analisadas em microscopia de luz e através de imuno-histoquímica para o marcador biológico Ki 67. Observou-se que os animais tratados com 5-FU 0,5% orabase apresentaram uma menor quantidade de células marcadas pelo Ki 67, com uma menor intensidade de coloração, indicando que houve uma menor proliferação celular nos animais tratados, confirmando que o 5-fluoruracil 0,5% em orabase poderá consistir em um recurso terapêutico eficaz no tratamento de lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

Palavras - chave: Carcinogênese. Camundongos. Fluoruracila. Biomarcadores.

ABSTRACT

5-fluorouracil (5-FU) is a chemotherapy of already consolidated use in the treatment of potentially malignant skin lesions. However, in the oral cavity, the use of topical chemotherapy for the treatment of potentially malignant lesions is not yet a reality. A topical treatment would avoid the postoperative discomfort caused by invasive procedures. Thus, this work aimed to evaluate the effectiveness of 5-fluorouracil antineoplastic in orabase in potentially malignant lesions of the lingual mucosa of mice, through the expression of the biological marker Ki 67. For this, Swiss albino male mice (*Mus musculus*) were submitted to the carcinogen 4-nitroquinolone-1-oxide (4NQO), 100 µg / mL, in the drinking water for 8 weeks. After the monitoring period of another 8 weeks, when they developed the carcinogenesis process in language, they were daily treated with a daily topical application of 5-FU in orabase, at concentrations of 0.5% and 5%, for 3 weeks. After euthanasia of the animals, the languages were removed, analyzed by light microscopy and by immunohistochemistry for the Ki 67 biological marker. Animals treated with 5-FU 0.5% orabase showed a lower amount of cells labeled with Ki 67, with a lower staining intensity, indicating that there was less cell proliferation in treated animals, confirming that 5-fluorouracil 0,5% in orabase may be an effective therapeutic resource in the treatment of potentially malignant lesions of the cavity oral.

Key-words: Carcinogenesis. Mice. Fluorouracil. Biomarkers

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	11
1.1	Introdução	13
2	METODOLOGIA	21
3	AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO 5-FLUORURACILA-ORABASE NO TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES EPITELIAIS DA MUCOSA LINGUAL DE CAMUNDONGOS INDUZIDAS PELO 4NQO	32
4	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A - Normas da revista.....	59
	ANEXO B - Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	70

1 APRESENTAÇÃO

As lesões potencialmente malignas da cavidade oral consistem em alterações histológicas epiteliais com possibilidade de transformação em lesões malignas, que quando diagnosticadas e tratadas precocemente, possibilitam um melhor prognóstico ao paciente¹. Essas lesões são muitas vezes tratadas através de sua remoção cirúrgica, o que conduz a um pós-operatório doloroso, com redução temporária da qualidade de vida do paciente².

Ainda não há um protocolo de tratamento tópico com antineoplásico definido para as lesões potencialmente malignas da cavidade oral, como já acontece com lesões potencialmente malignas de pele, as quais são tratadas topicamente com o 5-Fluoruracil (5-FU) creme³.

A fim de que um protocolo se estabeleça também para os tecidos da cavidade oral, estudos experimentais com animais de laboratório são necessários para a indução da carcinogênese, além de serem bastante úteis quando se pretende prever efetividade de um tratamento medicamentoso^{4,5,6}.

O 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO), carcinógeno potente, ao ser administrado em animais, induz a formação de todas as formas de alterações epiteliais da carcinogênese em mucosa oral^{7,8}, o que possibilita a avaliação da aplicabilidade do 5-FU em lesões potencialmente malignas, através de análises histológica e/ou imuno-histoquímica.

Assim, considerando a relevância que o tratamento precoce das lesões potencialmente malignas da cavidade oral possui no prognóstico do paciente, este trabalhou objetivou avaliar a efetividade do tratamento tópico dessas lesões através do uso do quimioterápico 5-fluoruracil em orabase, nas concentrações de 0,5% e 5%,

em mucosa lingual de camundongos induzidos ao processo de carcinogênese através do 4NQO. Os resultados foram obtidos através do estudo histopatológico e imuno-histoquímico para o biomarcador celular Ki 67, e foram expostos neste trabalho sob a forma de artigo científico.

1.1 Introdução

A carcinogênese oral consiste em um mecanismo de múltiplas etapas, fundamentado na alteração do ciclo celular, que está envolvido na transformação de uma célula saudável em uma célula com característica de malignidade. Quando na cavidade oral, uma das etapas desse processo consiste no desenvolvimento de lesões potencialmente malignas, muitas vezes presentes nas leucoplasias e eritroplasias⁹.

Esse processo de malignização dos tecidos se dá quando os mecanismos de proliferação, diferenciação, envelhecimento e apoptose celular estão desregulados. Isso ocorre quando o organismo não realiza reparo a nível de DNA, quando há resistência à apoptose, multiplicação de células com oncogenes ativos ou inativação dos genes supressores de tumor¹⁰.

Os biomarcadores são importantes indicadores desse processo de malignização das lesões potencialmente malignas, já que nem toda lesão diagnosticada histologicamente como displasia irá evoluir para um carcinoma, assim como, nem toda lesão maligna é oriunda de uma alteração epitelial pré-existente¹⁰.

A expressão de marcadores biológicos como DNA, RNA e proteínas, pode avaliar o status da lesão oral. A quantidade de proteínas no organismo, depende da condição fisiológica e patológica a que estão submetidos os indivíduos¹¹. Como por exemplo, em lesões potencialmente malignas, há a superexpressão de proteínas como a Ki 67¹².

Em casos de carcinoma epidermoide em região de cabeça e pescoço, a avaliação desse biomarcador, juntamente com a análise histopatológica, constituem

importantes recursos na predição da malignidade das lesões, podendo serem métodos auxiliares para a redução da alta taxa de morbidade e mortalidade que causam na população¹³.

A nucleoproteína Ki 67 é um importante biomarcador celular¹⁴. É considerado um marcador biológico confiável no que diz respeito à identificação da fase de proliferação da célula, já que está presente na fase G1 de replicação celular até o fim da mitose, mas está ausente na fase G0. Através de sua análise quantitativa, é possível identificar a fração de crescimento e duplicação celular, assim como estabelecer o prognóstico e o grau do tumor^{15,16}.

O Ki 67 está presente nas camadas basal e parabasal do epitélio normal da cavidade oral. Já em epitélios da cavidade oral em que há presença de displasia, também mostram-se presentes na camada espinhosa, com um aumento em sua expressão, já que mitoses frequentes acontecem¹⁷.

Nos casos de carcinoma espinocelular, a expressão da quantidade do Ki 67 evidencia o grau de diferenciação do tumor¹⁷, revelando-se um importante biomarcador, por também estar relacionado a definição do prognóstico do paciente^{16,18}. Em lesões displásicas, sua expressão aumenta à medida em que aumenta o grau de displasia¹⁹.

A superexpressão do Ki 67 pode ser útil para diferenciar lesões potencialmente malignas, de reações epiteliais atípicas sem potencial de malignidade. O aumento da quantidade do Ki 67, torna-o um fator indicativo de risco de transformação de uma reação tecidual atípica em malignidade²⁰.

Em avaliações de lesões leucoplásicas da cavidade oral, o Ki 67 também serve como um recurso bastante útil para detecção precoce de lesões com risco potencial

de transformação maligna²¹, além disso de ser útil na avaliação da efetividade do tratamentos dessas lesões.

Em humanos, as mutações a nível de DNA acontecem, muitas vezes, quando submetidos à ação de agentes químicos, como o tabaco e o álcool, os quais, ao serem consumidos concomitantemente, têm seus efeitos potencializados, podendo levar à formação de lesões potencialmente malignas da cavidade oral^{22,23}.

Formas variadas de indução de lesões potencialmente malignas da cavidade oral têm sido estudadas em modelos experimentais com animais, sendo a carcinogênese química uma das mais utilizadas^{4,8,24}.

A carcinogênese quimicamente induzida é desenvolvida em animais de laboratório como hamster, ratos e camundongos, através da administração de carcinógenos como o 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) e a 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO). Eles possibilitam a indução de todas as etapas da carcinogênese, facilitando o estudo do câncer²⁵.

Um dos modelos experimentais de carcinogênese mais utilizados ocorre através do uso do DMBA, o qual é aplicado com o auxílio de um pincel fino no tecido da cavidade oral do animal, induzindo a formação de lesões potencialmente malignas e malignas nos tecidos⁴.

Apesar de o DMBA ser bastante utilizado, o 4NQO é preferido, pois pode ser utilizado na água de beber, promovendo nos animais o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas em diversos sítios da cavidade oral¹³, principalmente na língua e no palato duro²⁶, garantindo resultados mais previsíveis, com menor intensidade de processo inflamatório dos tecidos¹³.

O 4NQO consiste em um potente carcinógeno químico, que induz a formação de graus variados e progressivos de alterações histológicas com o passar do tempo, como hiperplasia, lesões displásicas e carcinoma invasivo²⁷.

No entanto, lesões não são possíveis de serem visualizadas imediatamente ao final do tratamento com o 4NQO, e semanas são necessárias para que se desenvolvam. Dessa forma, possibilita-se mimetizar em animais, todos os estágios da carcinogênese, dos mais iniciais, ao carcinoma¹³.

Para que exerça sua ação carcinogênica, o 4NQO é enzimaticamente ativado *in vivo*, produzindo 4HAQO, o qual é convertido em aminoacil-4HAQO pela enzima aminoacil-4HAQO-tRNA sintetase, formando adutos de guanina ou adenina. Caso essas bases não sejam adequadamente reparadas, instala-se o processo de mutação e carcinogênese, já que a informação genética foi adulterada e fixada, com a substituição da guanina pela adenina²⁸.

Quando de sua administração na água de beber dos animais, a solução é preparada semanalmente, diluindo-se o pó do 4NQO diretamente em água, preservando a solução em recipiente protegido da luz, já que o mesmo é fotossensível, de acordo com o protocolo adotado por Faria et al. (2011)⁵.

Foram testadas diversas concentrações da solução de 4NQO para administração na água, durante diferentes períodos de tempo e com diferentes espécies de animais²⁷, possibilitando que se obtivesse um modelo experimental que possibilitasse um estudo eficaz do processo de carcinogênese.

O tempo de administração de 8 semanas da solução de 4NQO, 100µg/mL, na água de beber, foi tido como o protocolo ideal para causar uma incidência suficiente de hiperqueratose, displasias e carcinomas epidermóides na língua de camundongos.

Quando do uso desse protocolo experimental, e após monitoramento dos animais ao término do tratamento com o 4NQO por 8 semanas, houve a ocorrência de 40% de displasia epitelial e 60% de hiperqueratose. Enquanto, ao uso do protocolo de administração da solução de 4NQO, 50µg/mL, no mesmo período de tempo após o término da aplicação do carcinógeno, houve a ocorrência de 25% de displasias e 50% de carcinomas²⁹.

Faria et al. (2011)⁵ administraram 4NQO na concentração de 100µg/mL na água de beber de camundongos C57BL/6 por 16 semanas, monitorando-os por 16 e 32 semanas após o término da aplicação da droga, e observaram que houve uma diminuição no número de lesões displásicas com o passar do tempo, em detrimento do aumento do número de carcinomas.

Assim como há efetividade na indução de lesões potencialmente malignas da cavidade oral através da administração do 4NQO em baixas concentrações na água de beber, também há quando de sua aplicação tópica direta em palato ou língua⁸.

Schoop et al. (2009)³⁰ aplicaram 4NQO em propilenoglicol, 5mg/mL, em língua de camundongos CBA, três vezes por semanas, durante 16 semanas, e observaram-nos por mais 24, 28, 32, 36 e 40 semanas. Foi observado displasia moderada na 24ª semana, e carcinomas epidermóides após a 32ª semana.

A aplicação tópica direta possui a desvantagem de ser mais laboriosa e difícil, podendo ainda variar a quantidade da solução aplicada de animal para animal. Já a administração do 4NQO via água de beber, produz uma maior quantidade de lesões na cavidade oral quando comparada à aplicação tópica através de um pincel⁸.

O modelo de estudo animal que utiliza o 4NQO na água de beber mostra maior similaridade das características morfológicas, histopatológicas e moleculares com o

que ocorre na cavidade oral de humanos^{1,13}. Assim, esse modelo constitui um recurso satisfatório para o estudo de novas formas de terapia para as lesões potencialmente malignas, já que há grande similaridade entre a fisiologia animal e a humana¹.

Além disso, por possibilitarem a avaliação de biomarcadores metabólicos presentes no plasma sanguíneo, também mostram-se como recursos auxiliares no estudo do diagnóstico e tratamento precoce de lesões potencialmente malignas da cavidade oral²⁴.

Nos modelos experimentais que objetivaram esclarecimentos sobre o processo de carcinogênese, camundongos de diversas linhagens foram utilizados, tal como a linhagem C57Bl/6⁵.

Quando os animais imunodeficientes são utilizados, há a vantagem de certeza do desenvolvimento da lesão com rapidez. No entanto, a principal desvantagem consiste na ausência de linfócitos T funcionais, resultando em uma resposta não-fisiológica ao tumor³⁰.

Pela semelhança que os modelos experimentais possuem com o processo de carcinogênese humano, eles constituem o meio de estudo mais utilizado para a avaliação da efetividade de novas formas terapêuticas para o tratamento de lesões potencialmente malignas. Essa se torna uma questão importante ao se estabelecer a relevância da detecção e tratamento precoces das lesões potencialmente malignas da mucosa oral no prognóstico do paciente¹.

Uma possibilidade de tratamento menos invasivo para essas lesões, e que pode ser estudada e avaliada através desses estudos experimentais em animais, consiste na administração tópica de medicamento que agisse diretamente no DNA da

célula afetada⁶. Essa seria uma alternativa viável em substituição aos tratamentos cirúrgicos, com a remoção da lesão, resultando em um pós-operatório doloroso².

O 5-Fluoruracil consiste em um antineoplásico que atua diretamente no DNA, tendo seu mecanismo de ação bem estabelecido³¹, já que vem sendo utilizado de forma sistêmica em clínicas de oncologia de todo mundo por aproximadamente 50 anos³², para o tratamento de cânceres de colo retal³³, pulmão, cabeça e pescoço³ e pâncreas³⁴.

Seu mecanismo de ação se dá inicialmente através de sua ribosilação e fosforilação, assim como acontece com os nucleotídeos naturais. Logo após, ele une-se à enzima timidilato sintase, a qual é inibida, deixando de converter o nucleotídeo desoxiuridina em timidina. A redução no número de timidina resulta na diminuição da 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 saudáveis³.

Apesar de ser bastante utilizado de forma sistêmica para o tratamento de cânceres de cabeça e pescoço, topicamente apenas sugere-se seu uso associado ao tratamento quimioterápico sistêmico nos casos de pacientes acometidos por carcinoma epidermoide³⁵.

Não há na literatura trabalhos consistentes que abordem o tratamento de lesões potencialmente malignas da cavidade oral pelo 5-FU em humanos. Há relato de seu uso em mucosa de porco (*ex vivo*) e tecido epitelial reconstituído (*in vitro*), registrando a ocorrência de apoptoses e insignificante quantidade do antineoplásico permeando a mucosa e atingindo o plasma³⁵.

Topicamente, o 5-FU vem sendo utilizado sob a forma de creme em lesões potencialmente malignas de pele como a actino queratose, lesão que pode evoluir para um carcinoma epidermoide de pele³⁶, revelando um percentual de cura maior que 90 por cento. No entanto, esse valor poder ser comprometido com a descontinuidade do uso, já que o 5-fluoruracil ocasiona elevada irritabilidade ao tecido tratado, com intenso processo inflamatório. Por causa desse efeito colateral, concentrações menores dessa substância, como 0,5%, são preferidas pelos pacientes em detrimento das concentrações mais elevadas, como a de 5%³⁷.

O tratamento com o 5-FU em pele varia entre 1 e 4 semanas, já mostrando redução nas lesões após a primeira semana de tratamento com uma única aplicação diária³⁷.

Em pacientes que tiveram biopsiadas lesões de carcinoma epidermoide em córnea e conjuntiva, o tratamento tópico adjuvante com o 5-Fluoruracil 1% mostrou-se efetivo na prevenção da recorrência das lesões, sendo bem tolerado pelos pacientes³⁸.

Após essa consulta à literatura vigente atual, confirma-se a importância da análise do biomarcador biológico Ki 67 para o desenvolvimento de novas formas terapêuticas viáveis para o tratamento precoce das lesões potencialmente malignas da cavidade oral através de estudos experimentais com animais, já que a alteração genética está presente desde o início do processo de carcinogênese.

Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo geral, avaliar a efetividade do 5-fluoruracila em orabase no tratamento de lesões potencialmente malignas da mucosa do dorso de língua de camundongos, através da expressão do marcador biológico Ki 67.

Já os objetivos específicos são:

- a) Verificar, através do exame histopatológico, o acometimento da mucosa do dorso da língua dos camundongos por lesões potencialmente malignas e a possível evolução no grau de acometimento histológico com o passar do tempo;
- b) Avaliar, através do exame histopatológico e exame imuno-histoquímico para o marcador biológico Ki67, o comportamento das lesões potencialmente malignas após a administração tópica de 5-FU 0,5% em orabase, 5-FU 5% em orabase e apenas orabase, por 3 semanas;
- c) Avaliar os grupos tratados com o 5-FU 0,5% em orabase, 5-FU 5% em orabase e apenas orabase, 3 semanas após a interrupção do tratamento, através da análise histopatológica e imuno-histoquímica para o marcador Ki 67;
- d) Comparar a efetividade das concentrações do 5-FU em orabase no tratamento das lesões potencialmente malignas na mucosa lingual.
- e) Comparar a região de dorso e ventre da língua dos animais tratados com 5-FU ou Orabase quanto a intensidade e quantidade de marcação do Ki 67.

2 METODOLOGIA

DELINEAMENTO DA PESQUISA E GRUPOS DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental envolvendo o uso de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de processo: 23076.049868/2013-52. Setenta e dois camundongos

albinos *Swiss (Mus musculus)*, machos, fizeram parte do experimento, e foram divididos em 9 grupos experimentais com 8 animais cada (Grupos A, B, C, D, E, F, G, H, I). Esse número de animais se justificou pela relativa alta taxa de mortalidade dos animais ao ingerir o carcinógeno na água de beber, conforme evidenciado no trabalho de Tang et al. (2004)³⁹.

Iniciaram o experimento com 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas. Foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha, sob condições controladas de temperatura (22º) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Foi fornecida ração (Presence®) e água *ad libitum*. Ao final do experimento, os animais tiveram novamente seus pesos registrados.

Todos os animais foram induzidos à carcinogênese através do consumo do carcinógeno químico 4NQO (Sigma®) na água de beber, durante 8 semanas, conforme o trabalho de Hasina et al. (2009)²⁹.

PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO E DE APLICAÇÃO DO 4NQO

O tratamento com o 4NQO seguiu o protocolo descrito por Faria et al. (2011)⁵. O 4NQO foi diluído em água filtrada até atingir a concentração de 100 µg/mL. As soluções foram preparadas semanalmente e colocadas em garrafas envoltas por papel alumínio, a fim de que fossem protegidas da ação da luz ambiente, com administração *ad libitum*.

Houve o óbito de 27 animais durante o período de ingestão do carcinógeno, resultando em um total de 45 animais, que foram redistribuídos em 9 grupos de 5 animais cada, imediatamente antes do início da aplicação do antineoplásico.

Após esse período de indução da carcinogênese e reorganização dos grupos, os animais seguiram o seguinte protocolo (Tabela 1):

- Os Grupos A, B e C foram apenas monitorados por 8, 11 e 15 semanas após a administração do 4NQO, respectivamente, consumindo água sem adição de qualquer substância e ração *ad libitum*. O grupo A serviu de referência para evidenciar o grau histológico de acometimento no início do tratamento. Os grupos B e C foram os controles para os grupos tratados.

- Os Grupos D e G foram monitorados por 8 semanas após a administração do 4NQO e tratados por mais 3 semanas com o 5-FU 0,5% em orabase. Após esse período de tempo, o Grupo D foi eutanasiado e o Grupo G foi monitorado por mais 4 semanas, consumindo água sem adição de qualquer substância e ração *ad libitum*.

- Os Grupos E e H foram monitorados por 8 semanas após a administração do 4NQO e tratados por 3 semanas com o 5-FU 5% em orabase. Após esse período de tempo, o Grupo F foi eutanasiado e o Grupo H foi monitorado por mais 4 semanas, consumindo água sem adição de qualquer substância e ração *ad libitum*.

- Os Grupos F e I foram monitorados por 8 semanas após a administração do 4NQO e tratados por 3 semanas com orabase. Após esse período de tempo, o Grupo F foi eutanasiado e o Grupo I foi monitorado por mais 4 semanas, consumindo água sem adição de qualquer substância e ração *ad libitum*.

Os animais dos Grupos A, B e C foram monitorados em diferentes períodos de tempo a fim de se avaliar a possível progressão no grau das lesões histológicas com o passar do tempo, após a indução da carcinogênese pelo 4NQO.

Tabela 1 – Protocolo experimental adotado nos diferentes grupos de animais, após o tempo de 8 semanas de administração do 4NQO

Grupo	N	Tempo monitoramento pós 4NQO*	Procedimento adotado	Tempo tratamento com o 5-FU orabase*	Tempo monitoramento pós 5-FU orabase*	Tempo total*
A	5	8	4NQO	-	-	16
B	5	11	4NQO	-	-	19
C	5	15	4NQO	-	-	23
D	5	8	4NQO + 5-FU 0,5%	3	-	19
E	5	8	4NQO + 5-FU 5%	3	-	19
F	5	8	4NQO + orabase	3	-	19
G	5	8	4NQO + 5-FU 0,5%	3	4	23
H	5	8	4NQO + 5-FU 5%	3	4	23
I	5	8	4NQO + orabase	3	4	23

* Tempo em semanas

O tempo de monitoramento de 8 semanas após a administração do 4NQO para os grupos tratados foi estabelecido no trabalho de Hasina *et al.* (2009)²⁹ como tempo necessário para o aparecimento de lesões displásicas na mucosa lingual de camundongos. Já o tempo de 4 semanas de monitoramento dos animais após o tratamento tópico com o 5-FU/orabase, teve a finalidade de avaliar se haveria progressão ou estabilização do grau das lesões tratadas com o passar do tempo.

PROTOCOLO DE APLICAÇÃO DO 5-FLUORURACILA – ORABASE

A 5-Fluoruracila em orabase (Pharmapele®), nas concentrações de 0,5% e 5%, assim como apenas o veículo orabase, foram aplicados 01 vez ao dia, durante 03 semanas, sempre pelo período na manhã, no dorso da mucosa lingual dos animais de modo tópico através do auxílio de pincel chato.

Para que a aplicação tópica fosse possível, o animal foi contido de forma manual, teve a pele da cabeça tracionada, o que possibilitou a abertura de boca, e então sua língua foi apreendida por uma pinça, não havendo necessidade de anestesia. Após a aplicação do antineoplásico/orabase, os animais ficaram sem consumir água por 3 horas, a fim de possibilitar maior tempo de contato da droga e da orabase com a mucosa lingual.

EUTANÁSIA, DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

Os animais foram anestesiados através da associação de 100mg/kg de peso corpóreo de cloridrato de quetamina (Ceva®) e 10mg/kg de peso corpóreo de xilazina (Ceva®), por via intraperitoneal. Imediatamente após, os animais foram eutanasiados com uma dose excessiva de quetamina, associado à xilazina, utilizando-se o triplo da dose da solução anestésica utilizada anteriormente, aplicado por via intraperitoneal.

Após eutanásia, a língua foi removida e fixada em solução de Formalina Tamponada 10% por 24 horas. Cada língua foi seccionada transversalmente em seis fragmentos (dois de cada terço da língua), processada e incluída em parafina. Os cortes tiveram 5 µm de espessura e foram corados por hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscópio de luz.

Todas as lâminas foram analisadas por dois patologistas experientes, previamente calibrados para diagnosticar os espécimes conforme o sistema de gradação histológico proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁴⁰, sendo avaliadas e registradas as seguintes alterações: estratificação epitelial irregular; perda da polaridade das células da camada basal; projeções epiteliais em forma de gota; aumento do número de figuras de mitose; pérolas de queratina em projeções

epiteliais; núcleo de tamanho e forma anormal com hiperchromatismo; variação anormal de tamanho da célula; pleomorfismo celular; proporção núcleo/citoplasma aumentada. Se houvesse discordância entre os examinadores quanto ao grau histológico, o espécime era reavaliado até que houvesse concordância. A fim de possibilitar a análise estatística, as lesões foram quantificadas em valores numéricos de maneira crescente de acordo com a gravidade da lesão (Tabela 2).

Tabela 2– Características histológicas do epitélio oral que possibilitaram o diagnóstico histopatológico⁴⁰

Escore	Diagnóstico	Característica histológica
1.0	Normal	-----
2.0	Hiperplasia e/ou hiperqueratose	Acantose do estrato espinhoso e aumento da camada de queratose
3.0	Displasia leve	Alterações restringem-se ao terço inferior do epitélio (camadas basais e parabasais)
3.4	Displasia moderada	Alterações atingem o terço médio do epitélio (porção média da camada espinhosa)
3.8	Displasia severa	Alterações ultrapassam o terço médio do epitélio
4.0	Carcinoma invasivo	Ilhas de células cancerígenas na profundidade do tecido conjuntivo

Os fragmentos foram analisados em microscópio de luz (Leica® DM750) do laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco (Figura 1). Foi considerado o maior grau histológico de acometimento nos casos em que havia diferentes graus na mesma secção histológica.

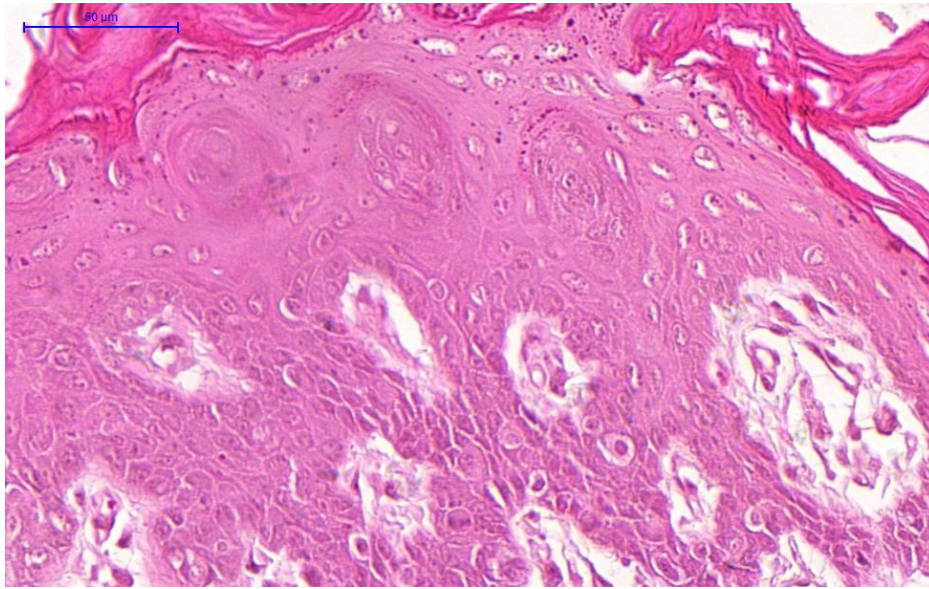


Figura 1 – Fotomicrografia de porção dorsal de língua de camundongo em HE / 50µm

DETERMINAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DO Ki 67

Os mesmos blocos de parafina utilizados para a análise histopatológica foram utilizados para a análise imuno-histoquímica. Todas as etapas da técnica da imuno-histoquímica foram realizadas nas dependências do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Inicialmente foi realizada a microtomia mecânica dos espécimes com espessura de 3 µm, e utilizadas lâminas previamente silanizadas (Knittel®). Os espécimes foram para a estufa a 60°, por um período de tempo de 03 horas. Logo após, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol (05 minutos cada) e reidratados por passagem em cadeia decrescente de etanol (02 banhos de 03 minutos

cada, em etanol absoluto, a 70% e a 50%) e água destilada (02 banhos de 03 minutos).

Para a recuperação antigênica, foi utilizada a solução de citrato (DBS®), pH 6.0, em panela de vapor (Steamer, Polishop®), por 30 minutos. Logo após, houve o resfriamento natural das lâminas por 20 minutos, e em seguida, lavagem rápida em solução tampão de fosfato Tween - PBS (Spring®). Todo procedimento a seguir, foi realizado a temperatura ambiente (22 C°).

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através do uso da solução de peróxido de hidrogênio 3%, por 10 minutos, seguindo-se pela lavagem em PBS por 03 minutos. Logo após, foi aplicada a solução para bloqueio de proteínas (Spring®), por 10 minutos. Após esse tempo, foi retirado o excesso do bloqueador, e aplicado o anticorpo Anti-Ki67 (Abcam® - AB15580; 1,5µl/1mL) por 01 hora em câmara úmida.

Passado o tempo de incubação do anticorpo, lavaram-se os espécimes em PBS por 03 minutos, e aplicou-se o sistema de revelação (Histofine polímero, Nichirei®) por 30 minutos, em câmara úmida. Após nova lavagem em PBS por 03 minutos, corou-se com o DAB líquido, diaminobenzidina (Spring®), por 05 minutos, e repetiu-se uma nova lavagem rápida em PBS e imersão em água destilada.

Os espécimes seguiram para contra-coloração com hematoxilina de Harris (Qeel®), imersão por 01 minuto, lavagem em água corrente por 05 minutos, desidratação através de passagem em bateria crescente de etanol (02 banhos de 02 minutos cada em etanol a 50%, 70% e absoluto), 02 banhos de xilol (05 minutos cada), e montagem com Entellan® e lamínula de vidro.

Foram utilizados como controle positivo, cortes de carcinoma epidermoide em mucosa de língua de camundongo previamente confirmados como positivos para o

marcador estudado; e negativo, lâminas desse mesmo tumor substituindo-se o anticorpo primário por soro fisiológico.

INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A marcação para o anticorpo foi considerada positiva quando as células apresentavam cor acastanhada, independente da intensidade da coloração. A análise foi realizada por 2 examinadores previamente calibrados, e para que isso fosse possível, as lâminas foram escaneadas através do escâner Pannoramic Midi® do laboratório de Patologia Oral da UFPE.

Então, para cada terço da língua, foram tomadas 02 imagens com objetiva de 40X, através das quais foram calculadas as porcentagens de células marcadas para o Ki 67. Esse valor foi obtido calculando-se a relação da quantidade de células marcadas pelo anticorpo para o Ki 67, pelo total de células visualizadas no campo, multiplicando-se por 100. Através da média das porcentagens dos três terços da língua, enquadrrou-se o animal em 04 graus distintos, como mostrado na tabela 3, para possibilitar a análise estatística entre os grupos (Figura 2).

Tabela 3: Valores de escore para a quantificação da imunorreatividade para o Ki 67

Escore	Intervalo percentual de células imuno reativas
0	0-5% das células positivas
1	>5% e ≤25% das células positivas
2	>25% e ≤50% das células positivas
3	>50% das células positivas

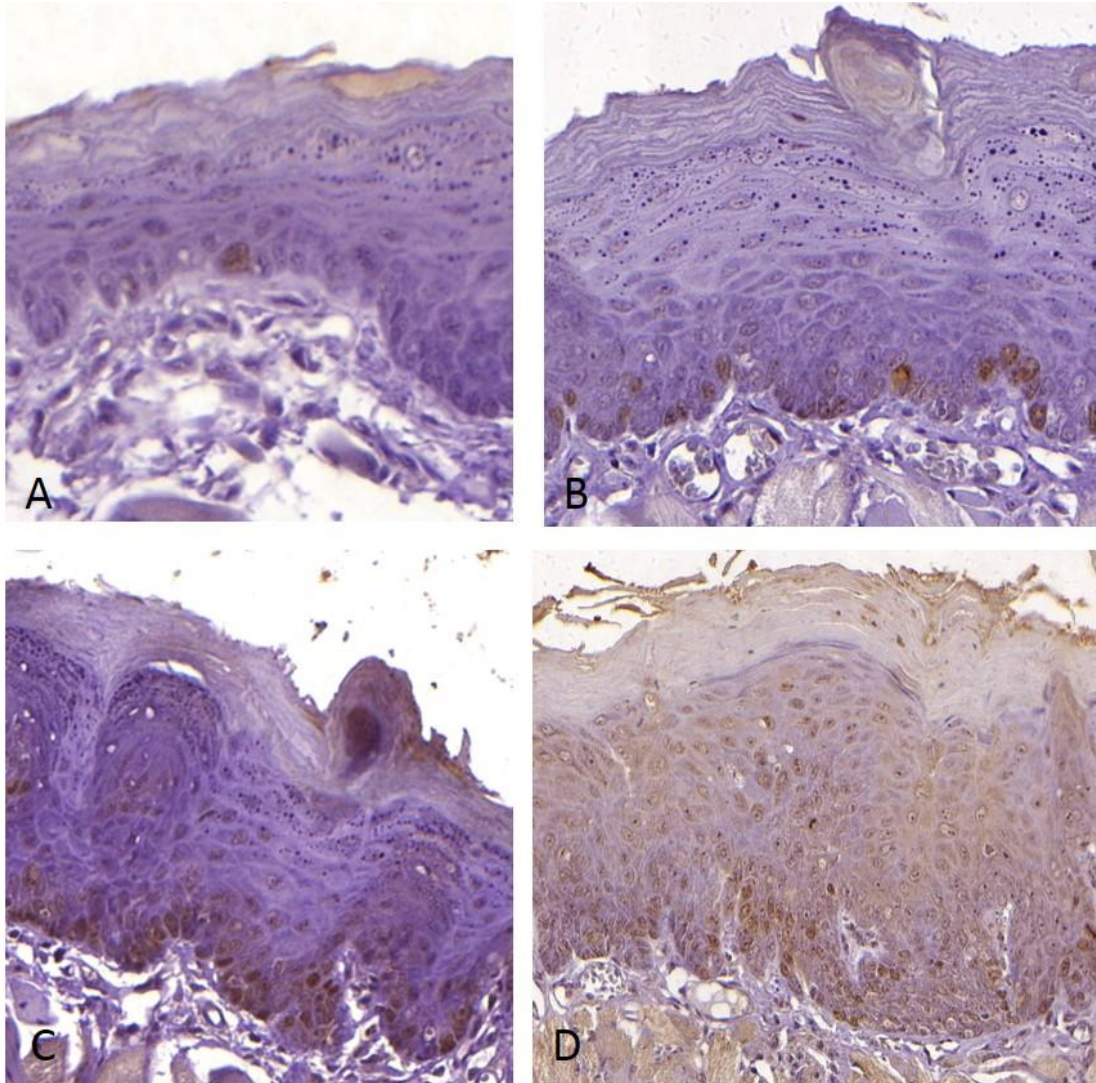


Figura 2 – Fotomicrografias de dorso de língua de camundongos para análise da quantidade de células marcadas, para o Ki 67 / 50 μ m. (A) Entre 0 e 5% de células marcadas; (B) maior que 5% e menor ou igual a 25%; (C) maior que 25% e menor ou igual a 50%; (D) maior que 50%.

As imagens também foram avaliadas quanto a intensidade de coloração das células (Figura 3) e receberam um escore de acordo com a maior prevalência de coloração para as células coradas em marrom, conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Valores para intensidade da coloração da marcação

Escore	Intensidade de marcação
0	Negativa
1	Fraca
2	Moderada
3	Forte

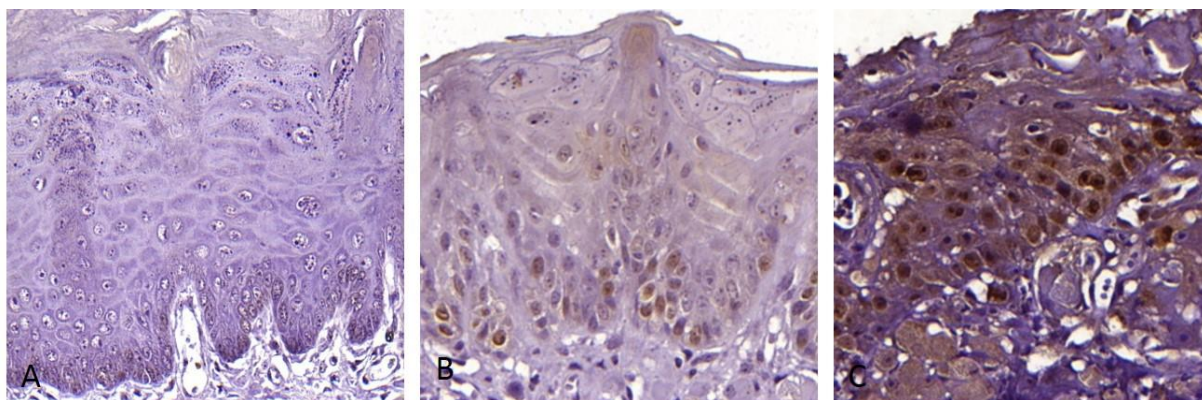


Figura 3 – Fotomicrografias de dorso de língua de camundongos para análise da intensidade de coloração das células marcadas para Ki 67 / 50µm. (A) Intensidade de marcação fraca, (B) moderada e (C) forte.

Quanto a análise estatística, foram utilizados os seguintes testes: Exato de Fisher, a fim de verificar a existência de associação; Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos; Kruskal Wallis, para comparação de mais de dois grupos. Para isso, usou-se os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão.

3 AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO 5-FLUORURACILA-ORABASE NO TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES EPITELIAIS DA MUCOSA LINGUAL DE CAMUNDONGOS INDUZIDAS PELO 4NQO

INTRODUÇÃO

As lesões potencialmente malignas da cavidade oral consistem em alterações histológicas epiteliais com possibilidade de transformação em lesões malignas, que quando diagnosticadas e tratadas precocemente, possibilitam um melhor prognóstico ao paciente¹.

Uma variedade de alterações moleculares e bioquímicas está associada ao processo de carcinogênese², sendo os biomarcadores importantes indicadores do processo de malignização das lesões potencialmente malignas³.

A nucleoproteína Ki 67 é um desses importantes biomarcadores, já que está relacionado à proliferação celular⁴. Através de sua análise quantitativa, é possível identificar a fração de crescimento e duplicação celular, assim como estabelecer o prognóstico e o grau de lesões, revelando a eficácia ou ineficácia de uma medicação^{5,6}.

Um dos tratamentos para muitas das lesões potencialmente malignas da cavidade oral consiste em sua remoção cirúrgica, o que pode conduzir a um pós-operatório doloroso. Uma possibilidade de tratamento menos invasivo para essas lesões, consistiria na administração tópica de medicamentos que agissem diretamente no DNA da célula afetada⁷.

O 5-Fluoruracil (5-FU) é um exemplo dessas medicações, já que é um antineoplásico que atua diretamente no DNA. O 5-FU tem seu mecanismo de ação

bem estabelecido⁸, já que vem sendo utilizado há anos de forma sistêmica em clínicas de oncologia de todo mundo, para o tratamento de diversos tipos de cânceres^{9,10,11}. No entanto, ainda não há um protocolo definido para o tratamento tópico com o 5-FU em lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

Para que esse protocolo se estabeleça, estudos experimentais com animais de laboratório são necessários. Há neles a indução da carcinogênese e, em seguida, o tratamento das lesões com antineoplásico¹², cuja efetividade pode ser avaliada através da expressão de biomarcadores celulares, como a proteína Ki 67^{13,14}.

Considerando a relevância que o tratamento precoce das lesões potencialmente malignas da cavidade oral possui no prognóstico do paciente, este trabalhou objetivou avaliar a efetividade do tratamento tópico dessas lesões através do uso do quimioterápico 5-fluoruracil em orabase, nas concentrações de 0,5% e 5%, em mucosa do dorso da língua de camundongos induzidos ao processo de carcinogênese através do 4NQO. Os resultados foram obtidos através do estudo histológico e imuno-histoquímico do biomarcador celular Ki 67.

METODOLOGIA

Delineamento da pesquisa e grupos de estudo

Trata-se de um estudo experimental envolvendo o uso de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco. Setenta e dois camundongos machos albinos *Swiss (Mus musculus)* fizeram parte do experimento, e foram divididos em 9 grupos experimentais, com 8 animais cada. Esse

número se justificou pela relativa alta taxa de mortalidade dos animais ao beberem o carcinógeno, conforme evidenciado no trabalho de Tang et al. (2004)¹⁵.

Os camundongos iniciaram o experimento com 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas. Foram mantidos em gaiolas forradas com maravalha, sob condições controladas de temperatura (22°), ciclo claro-escuro de 12 horas e ração (Presence®) e água *ad libitum*. Ao final do experimento, os animais foram novamente pesados.

Todos os animais foram induzidos à carcinogênese através do consumo do carcinógeno químico 4NQO (Sigma®) na água de beber¹⁴, durante 8 semanas¹⁶. Após esse período de tempo, permaneceram no experimento 45 animais, que foram redistribuídos em 9 grupos de 5 animais cada, antes do início da aplicação do antineoplásico, e seguiram os seguintes protocolos, conforme a Tabela 1:

Tabela 1 – Protocolo experimental adotado nos diferentes grupos de animais, após o tempo de 8 semanas de administração do 4NQO

Grupo	N	Tempo monitoramento pós 4NQO*	Procedimento adotado	Tempo tratamento com o 5-FU orabase*	Tempo monitoramento pós 5-FU orabase*	Tempo total*
A	5	8	4NQO	-	-	16
B	5	11	4NQO	-	-	19
C	5	15	4NQO	-	-	23
D	5	8	4NQO + 5-FU 0,5%	3	-	19
E	5	8	4NQO + 5-FU 5%	3	-	19
F	5	8	4NQO + orabase	3	-	19
G	5	8	4NQO + 5-FU 0,5%	3	4	23
H	5	8	4NQO + 5-FU 5%	3	4	23
I	5	8	4NQO + orabase	3	4	23

* Tempo em semanas

Os animais dos Grupos A, B e C foram monitorados (observados consumindo apenas ração e água *ad libitum*) em diferentes períodos de tempo, a fim de se avaliar a possível progressão no grau das lesões histológicas com o passar do tempo, após a indução da carcinogênese pelo 4NQO.

O tempo de monitoramento de 8 semanas após a administração do 4NQO para os grupos tratados, foi estabelecido no trabalho de Hasina *et al.* (2009)¹⁶ como tempo necessário para o aparecimento de lesões displásicas na mucosa lingual de camundongos. Já o tempo de 4 semanas de monitoramento dos animais após o tratamento tópico com o 5-FU - orabase, teve a finalidade de avaliar se haveria progressão ou estabilização do grau das lesões tratadas com o passar do tempo.

A 5-Fluoruracila em orabase (Pharmapele®), nas concentrações de 0,5% e 5%, ou apenas a orabase, foram aplicadas no dorso da mucosa lingual dos animais de modo tópico através do auxílio de pincel chato, 01 vez ao dia, pelo período da manhã, durante 03 semanas. Para que a aplicação tópica fosse possível, o animal foi contido de forma manual, e teve sua língua tracionada por uma pinça, sem necessidade de anestesia. Após a aplicação, os animais ficaram sem consumir água por 3 horas, a fim de possibilitar maior tempo de contato do antineoplásico e da orabase com a mucosa lingual.

Eutanásia, dissecação e preparação histológica

Os animais foram anestesiados através da associação de 100mg/kg de peso corpóreo de cloridrato de quetamina (Ceva®) e 10mg/kg de peso corpóreo de xilazina (Ceva®), por via intraperitoneal. Imediatamente após, os animais foram eutanasiados

com uma dose excessiva de quetamina, associado à xilazina, utilizando-se o triplo da dose da solução anestésica utilizada anteriormente, aplicado por via intraperitoneal.

Após eutanásia, a língua foi removida e fixada em solução de Formalina Tamponada 10% por 24 horas. Cada língua foi seccionada transversalmente em seis fragmentos (dois de cada terço da língua), processada e incluída em parafina. Os cortes tiveram 5 µm de espessura e foram corados por hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscópio de luz.

Todas as lâminas foram analisadas por dois patologistas experientes, previamente calibrados conforme os sistemas de gradação histológica propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁷, sendo considerado o maior grau histológico de acometimento nos casos em que havia diferentes graus na mesma secção histológica. As lesões foram quantificadas através de escores, a fim de possibilitar a análise estatística.

Para a realização da imuno-histoquímica, após microtomia mecânica (3 µm) e utilização de lâminas previamente silanizadas (Knittel®), os espécimes passaram por 3h em estufa a 60º, foram desparafinizados em xilol e reidratados por passagem em cadeia decrescente de etanol e água destilada, e seguiu-se o protocolo (Tabela 2):

Tabela 2: Sequência da técnica da imuno-histoquímica utilizada

Etapa			Tempo	Utilizado
Recuperação	antigênica	em	30'	Citrato de sódio (DBS®, ph 6.0)
panela a vapor				
Bloqueio da peroxidase endógena			10'	Peróxido de hidrogênio 3%
Bloqueio das proteínas			10'	Solução para bloqueio de proteínas (Spring®)
Aplicação do anticorpo Anti-Ki67,			01 hr	Abcam® - AB15580; 1,5µl/1mL
22°C				
Revelação			30'	Histofine polímero, Nichirei®
Coloração			5'	Diaminobenzidina (Spring®)

Após cada etapa da imuno-histoquímica, os espécimes foram lavados em PBS por 03 minutos. Ao final, foram contra corados com hematoxilina de Harris, seguindo para o processo de desidratação através de passagem em bateria crescente de etanol, xilol e montagem com Entellan® e lamínula de vidro.

Foi utilizado como controle positivo, corte de carcinoma epidermoide em mucosa de língua de camundongo; e negativo, lâminas desse mesmo tumor, substituindo-se o anticorpo primário por soro fisiológico.

A marcação para o anticorpo foi considerada positiva quando as células apresentavam cor acastanhada, independente da intensidade da coloração. A análise

foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, para identificarem as células imunorreativas para o Ki 67, e classificarem a intensidade de cor da célula marcada em fraca, moderada e forte. Para que fosse possível a realização das análises, as lâminas foram escaneadas e avaliadas através do software Pannoramic Viewer®.

Então, para cada terço da língua, foram tomadas 02 imagens com a objetiva de 40X, através das quais foram calculadas as porcentagens de células marcadas para o Ki 67. Esse valor foi obtido calculando-se a relação da quantidade de células marcadas pelo anticorpo, pelo total de células visualizadas no campo, multiplicando-se por 100. Através da média das porcentagens dos três terços da língua, enquadrrou-se o animal em 04 graus distintos, como mostrado na tabela 3, para possibilitar a análise estatística entre os grupos (Figura 1).

Tabela 3: Valores de escore para a graduação da quantificação da imunorreatividade para o Ki 67

Escore	Intervalo percentual de células imuno reativas
0	0-5% das células positivas
1	>5% e ≤25% das células positivas
2	>25% e ≤50% das células positivas
3	>50% das células positivas

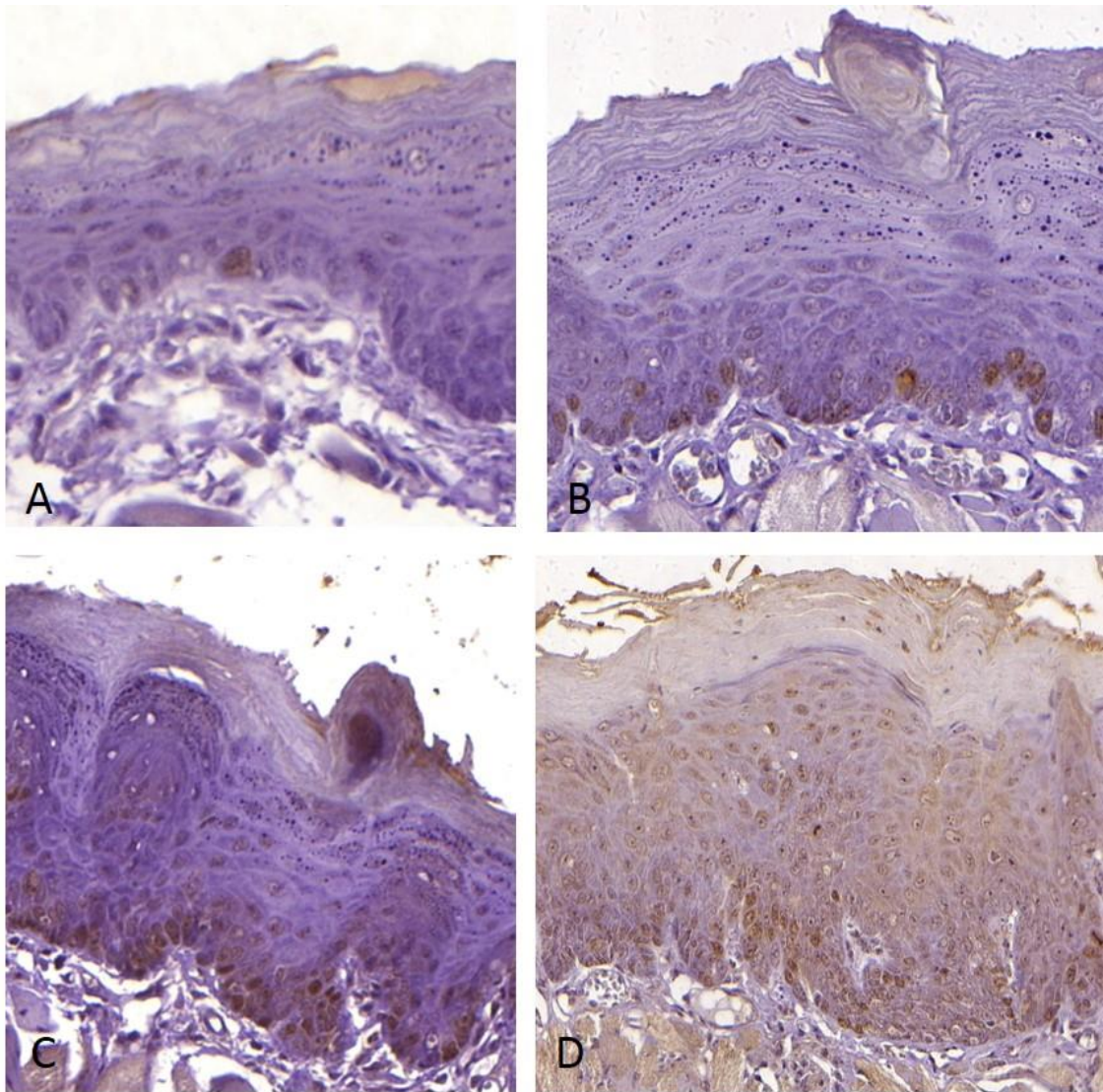


Figura 1 – Fotomicrografias do dorso de língua de camundongos para análise da quantidade de células imunorreativas / 50 μ m. (A) Entre 0 e 5% de células marcadas; (B) maior que 5% e menor ou igual a 25%; (C) maior que 25% e menor ou igual a 50%; (D) maior que 50%.

As imagens também foram avaliadas quanto a intensidade de coloração das células (Figura 2) e receberam um escore de acordo com a maior prevalência de coloração para as células coradas em marrom, conforme a tabela 4.

Tabela 4 - Valores para intensidade da coloração da marcação

Escore	Intensidade de marcação
0	Negativa
1	Fraca
2	Moderada
3	Forte

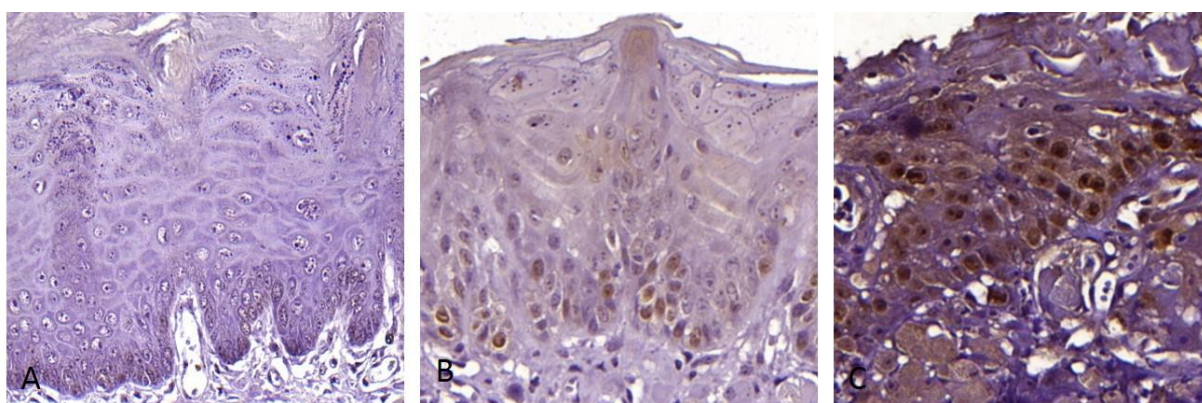


Figura 2 – Fotomicrografias de dorso de língua de camundongos para análise da intensidade de coloração das células marcadas para Ki 67 / 50µm. (A) Intensidade de marcação fraca, (B) moderada e (C) forte.

Para a análise estatística, foram utilizados os seguintes testes: Exato de Fisher, a fim de verificar a existência de associação; Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos; Kruskal Wallis, para comparação de mais de dois grupos. Para isso, usou-se os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão.

RESULTADOS

O experimento foi iniciado com um total de 72 camundongos. No entanto, houve o óbito de 27 animais durante o período de administração do 4NQO, perda de 37,5% da amostra inicial. Resultou então, em uma amostra de 45 animais, que foram redistribuídos em 9 grupos de 5 camundongos, logo após o período da administração do 4NQO.

Os camundongos iniciaram o experimento com uma média de peso de 27,5 gramas, e ao final apresentaram um valor médio de 23,5 gramas. Houve perda progressiva de peso com o passar do tempo, sendo necessário abreviar o experimento para 3 semanas de tratamento com o 5-FU, tempo que poderia ter sido estendido até 4 semanas, caso houvesse condições físicas dos animais.

Devido ao processo inflamatório dos tecidos (mucosite), causado pelos efeitos colaterais comuns ao antineoplásico, foi possível observar, ao final do tempo de aplicação do 5-FU, intensa coloração avermelhada do dorso da língua, e facilidade ao sangramento ao serem pinçadas, fator que também contribuiu para a interrupção do tratamento.

Todas as línguas examinadas (100%) revelaram alterações histológicas, variando entre displasia leve, displasia moderada, displasia severa e carcinoma invasivo.

O grupo A (controle 1), que serviu de parâmetro para expressar a fase inicial predominante das lesões a serem tratadas, teve maior prevalência de lesões do tipo displasia leve. Com a manutenção dos animais por mais 3 semanas no experimento (Grupo B – controle 2), em relação ao Grupo A, houve evolução no grau das lesões, com presença de displasias severas. Já no Grupo C (controle 3), que permaneceu no experimento por mais 4 semanas, em relação ao grupo B, prevaleceram carcinomas

invasivos. Essa evolução no grau histológico com o passar do tempo foi acompanhada também pela maior expressão do biomarcador Ki 67 (Tabela 5).

Tabela 5 – Progressão do grau das lesões entre os grupos controles, com o passar de 16 (Grupo A), 19 (Grupo B) e 23 (Grupo C) semanas, após o início do experimento. Expressão da intensidade e quantidade de marcação imuno-histoquímica para o Ki67.

		A					B					C					p valor
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Histopatológico	Displasia leve		x	x		x											0.012*
	Displasia moderada	x			x		x			x							
	Displasia severa						x	x					x				
	Carcinoma invasivo								x			x		x	x	x	
Intensidade Ki67	Fraca	80%					80%					0%					0.007*
	Moderada	20%					20%					20%					
	Forte	0%					0%					80%					
Quantidade Ki67	Média/DP	17,60 / 9,60					32,40 / 6,50					76,20 / 23,72					0.003*

DP: Desvio padrão. *Estatisticamente significativa ($p < 0.05$)

Ao comparar o Grupo A, com os grupos tratados com 5-FU (Grupos D, E, G e H), observou-se que não houve progressão suficiente no grau das lesões para causar significância estatística ($p > 0.05$). Esse dado serve de fundamentação para confirmar a eficácia do 5-FU em orabase no impedimento do agravamento de lesões potencialmente malignas com o passar do tempo, como ocorre nos processos de carcinogênese.

Já, quando esse mesmo Grupo A foi comparado com os grupos tratados apenas com orabase (Grupos F e I), houve diferença estatisticamente significativa

entre eles ($p < 0.05$), o que vem a afirmar que apenas a aplicação do veículo orabase não impediu a progressão das lesões para um grau mais elevado com passar do tempo.

Nos grupos tratados com 5-FU e monitorados pós tratamento (Grupos G e H), prevaleceram lesões do tipo displasia leve e moderada. Já no grupo controle não tratado (Grupo C), houve prevalência de carcinoma invasivo, evidenciando que houve um impedimento de progressão do grau histológico das lesões tratadas com o antineoplásico ($p < 0.05$). Apenas o grupo tratado com o 5-FU 0,5% (Grupo G) apresentou significância estatística, quando comparado ao seu controle, para a análise imuno-histoquímica (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão da intensidade e quantidade de marcação das células para o Ki 67 e comparação entre os grupos C e G.

		Grupo C	Grupo G	p valor
Intensidade	Fraca	0%	100%	0.008*
	Moderada	20%	0%	
	Forte	80%	0%	
Quantidade	Média/DP	76,20 / 23,72	22,60 / 11,10	0.048*

DP: Desvio padrão. *Estatisticamente significativa ($p < 0.05$)

Também houve ausência da progressão do grau histológico das lesões com o passar do tempo ($p > 0.05$), ao se comparar o grupo tratado com 5-FU 0,5%, que permaneceu até o fim do experimento (Grupos G), com aqueles tratados com 5-FU e que foram imediatamente sacrificados ao final do tratamento. Esse dado mostra que não houve progressão relevante da carcinogênese após a interrupção da aplicação

tópica do antineoplásico durante o período de tempo de monitoramento pós tratamento deste estudo, que foi de 03 semanas.

Já nos grupos tratados com 5-FU 5% ou com o veículo orabase apenas, não se evidenciou efetividade para a redução da intensidade e da quantidade de células marcadas para o Ki 67, quando comparados aos seus grupos controles ($p>0.05$).

Ao comparar-se ventre e dorso de língua quanto a intensidade e quantidade de marcação das células para o Ki 67, observou-se uma menor expressão de marcação das células na região de dorso de língua dos animais tratados com 5-FU 0,5% ($p<0.05$). Essa informação evidencia que há efetividade do tratamento tópico para a região em que foi aplicado diretamente o antineoplásico, já que há uma maior expressão da proteína Ki 67 na área não tratada (Figura 3).

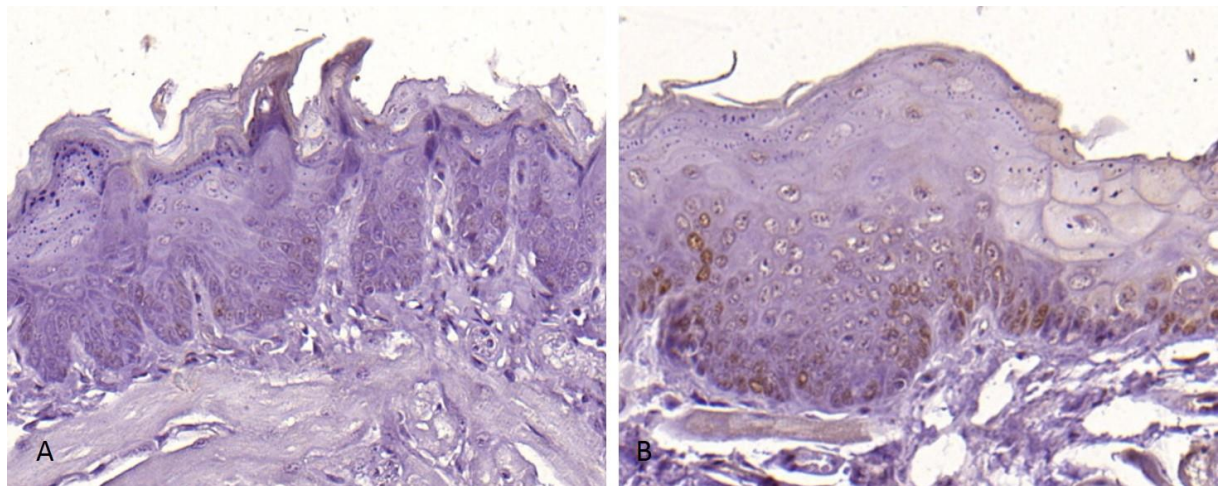


Figura 3 – Imagens comparativas do dorso (A) e ventre (B) da língua do mesmo camundongo do Grupo D - tratado com 5-FU 0,5% em orabase (20X).

DISCUSSÃO

A nucleoproteína Ki 67 é um importante biomarcador⁴, considerado confiável no que diz respeito à identificação da fase de proliferação celular, já que está presente na fase G1 de replicação celular até o fim da mitose, mas está ausente na fase G0. Através de sua análise quantitativa é possível identificar a fração de crescimento e duplicação celular, estabelecer o prognóstico e o grau de lesões^{5,6}. Por essas características, o Ki 67 foi utilizado neste estudo para revelar se o 5-FU é eficaz na estabilização do processo de carcinogênese da cavidade oral.

Através dessa ideia, foi possível observar, que nos grupos tratados com 5-FU em orabase, na concentração de 0,5%, houve uma menor intensidade da coloração das células imuno reativas, assim como uma menor quantidade das células marcadas pelo Ki 67, tanto imediatamente após a aplicação do 5-FU, quanto após um período de tempo de monitoramento dos animais, quando comparados com seu grupo controle. Isso indicou uma menor proliferação celular e efetividade do antineoplásico frente às lesões potencialmente malignas do dorso de língua dos camundongos.

Esse resultado só foi possível de ser observado, porque o processo de carcinogênese é progressivo com o passar do tempo¹⁸, o que viabilizou determinar uma nova forma terapêutica através da observação ou não da estabilização do grau histológico das lesões potencialmente malignas.

A análise imuno-histoquímica, além de ser útil para detecção precoce de lesões com risco potencial de transformação maligna, como mostrado no estudo de Gissi et al. (2015)¹⁹, que ressaltou a importância da avaliação da expressão imuno-histoquímica do marcador biológico Ki 67 em lesões leucoplásicas da cavidade oral,

também serve para avaliar a efetividade de uma medicação frente essas lesões, como mostrado neste estudo.

Dragomir et al. (2012)²⁰ também estabeleceu que há uma estreita correlação entre o grau histológico e a expressão do Ki 67. Quanto maior o grau histológico, maior a proliferação celular, e mais intensa a expressão do Ki 67, seja em quantidade de células marcadas ou em intensidade de cor, corroborando com os dados deste trabalho.

A superexpressão do Ki 67 pode ser útil para diferenciar lesões potencialmente malignas, de reações epiteliais atípicas sem potencial de malignidade. Sendo assim, essa expressão aumentada pode tornar o Ki 67 um fator indicativo de risco de transformação de uma reação tecidual atípica em malignidade²¹.

O Ki 67 já vem sendo usado na área da saúde como um fator preditivo no prognóstico de cânceres e lesões potencialmente malignas nas mais diversas especialidade médicas^{5,6,22,23}. No entanto, ainda são inexistentes estudos na área da Odontologia que correlacionem a expressão do Ki 67 com tratamentos tópicos para lesões potencialmente malignas da cavidade oral em humanos, apesar da efetividade tópica do 5-FU em orabase já ter sido avaliada apenas através de análise histopatológica em camundongos¹².

O que há, são estudos que avaliam o uso tópico do 5-FU em mucosa de porco (*ex vivo*) e tecido epitelial reconstituído (*in vitro*), e que registram a ocorrência de apoptoses e insignificante quantidade do antineoplásico permeando a mucosa e atingindo o plasma²⁴.

Outro estudo na área de Odontologia²⁵, avalia o uso tópico do 5-FU a 5% em pacientes com cisto odontogênico queratinizado, e conclui que esse antineoplásico,

quando utilizado após a enucleação do tumor, consiste em um recurso eficaz no tratamento dessas lesões, levando a menor morbidade pós-operatória, quando comparado aos tratamentos convencionais.

Já na dermatologia e na oftalmologia, diversos estudos confirmam a efetividade do tratamento tópico do 5-FU frente as lesões potencialmente malignas, levando o paciente a um bom prognóstico^{23,26}.

Para que fosse possível estabelecer uma nova conduta terapêutica na Odontologia, fez-se necessário o uso de experimento animal. A indução da carcinogênese em pesquisa experimental já está bem consolidada através de inúmeros estudos que buscaram a forma ideal de reproduzir a carcinogênese no animal, assim como ocorre em seres humanos.

Dentre as inúmeras metodologias possíveis, neste estudo optou-se pelo que é considerado padrão ouro na literatura para a indução da carcinogênese, com a utilização do carcinógeno 4NQO na água de beber de camundongos¹⁶. O uso dessa espécie de animal se justificou pelos tecidos de sua cavidade oral serem histologicamente mais semelhantes ao humano, do que outros animais², mimetizando com maior fidelidade o tratamento em pessoas.

Já o estudo da língua, e não de outro sítio da cavidade oral, justificou-se por ser o local mais acometido por lesões potencialmente malignas quando da indução da carcinogênese com o 4NQO na água de beber, e também porquê a ocorrência dessas lesões em língua está fortemente associada com a possibilidade de malignização²⁷.

Uma limitação deste estudo, foi o número de perda de animais durante o período de administração do carcinógeno, da mesma forma que ocorreu em outros

estudos¹². Isso deveu-se a alta toxicidade do carcinógeno, que também induz a formação de lesões no trato aerodigestivo²⁸.

A debilidade dos animais também foi uma limitação, o que fez com que o tempo de tratamento tópico com o 5-FU fosse de três semanas, e não de quatro, como indica a literatura ser o tempo máximo de aplicação²⁹. No entanto, diversos estudos mostram que o tempo de 01 semana de aplicação tópica do 5-FU já é suficiente no tratamento de muitas lesões potencialmente malignas, e que o tempo máximo de tratamento, muitas vezes não é alcançado por causa dos efeitos adversos próprios da medicação, como a mucosite²⁹.

Esses efeitos também podem ter determinado, neste estudo, a menor concentração do 5-FU (0,5%) ter sido mais eficaz que a concentração a 5%, já que segundo a literatura, menores concentrações seriam biologicamente mais aceitáveis, já que causam menor irritabilidade aos tecidos²⁹.

Essa nova forma terapêutica frente às lesões potencialmente malignas da cavidade oral revela-se, do ponto de vista preventivo, bastante eficaz, já que essas lesões podem representar um risco pela predisposição ao câncer de boca³⁰. Apesar de a minoria dessas alterações epiteliais se transformarem em lesões malignas, caso sejam diagnosticadas e tratadas precocemente, possibilitam um melhor prognóstico ao paciente, com maiores chances de cura²⁷.

CONCLUSÃO

O antineoplásico 5-fluoruracil em orabase 0,5%, quando aplicado de forma tópica no dorso de língua de camundongos, mostrou-se eficaz na estabilização do grau de lesões potencialmente malignas durante o processo de carcinogênese, já que houve uma menor intensidade e quantidade de células imuno reativas para o Ki 67 no dorso da língua dos animais tratados. Então conclui-se, que o 5-fluoruracil 0,5% em orabase poderá consistir em um recurso terapêutico eficaz no tratamento de lesões potencialmente malignas da cavidade oral, sendo necessários estudos complementares para extrapolar seu uso para os humanos.

REFERÊNCIAS

1. Tang X, Osei-Sarfo K, Urvalek AM, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Combination of bexarotene and the retinoid CD1530 reduces murine oral-cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(24): 8907–8912.
2. Rivera MCA. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. *Int J Morphol*. 2012; 30(1):309-314.
3. Bascones-Martínez A, et al. Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. *Oncol lett*. 2012; 3:1319-1325.
4. Viswanathan V, Juluri R, Goel S, Madan J, Mitra SK, Gopalakrishnan D. Apoptotic Index and Proliferative Index in Premalignant and Malignant Squamous Cell Lesions of the Oral Cavity. *J Int Oral Health*. 2015; 7(1):40-43.
5. Kim C, et al. Prognostic role of p53 and Ki-67 immunohistochemical expression in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a retrospective study. *J Thorac Dis*. 2015; 7(5):822-833.
6. Yu J, Zhou Q, Zheng Y, Bao Y. Expression of Vimentin and Ki-67 Proteins in Cervical Squamous Cell Carcinoma and their Relationships with Clinicopathological Features. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16:4271-4275.

7. Ge L, Wu Y, Wu L, Zhang L, Xie B, Zeng X, et al. Case report of rapidly progressive proliferative verrucous leukoplakia and a proposal for aetiology in mainland China. *World J Surg Oncol*. 2011; 9:26-30.
8. Yeh CT, Chen HC, Sung CM, Hsu CL, Lin CC, Pan KT, et al. Retrospective comparison between a regular and a split-dose protocol of 5-fluorouracil, cisplatin, and mitoxantrone for the treatment of far advanced hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2011; 11:117-142.
9. Iwahashi S, Ishibashi H, Utsunomiya T, Morine Y, Ochir TL, Hanaoka J, et al. Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines. *The J Med Invest*. 2011; 58:106-109.
10. Parker JB, Stivers JT. Dynamics of Uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochem*. 2011; 50(5):612–617.
11. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic Antitumor Effect of Dichloroacetate in Combination with 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:740564.
12. Costa GBF, Almeida ER, Cavalcanti FGB, Castro JFL. The effects of topical treatment with 5-fluorouracil on potentially malignant lesions of mice oral mucosa. *J Morphol Sci*. 2015; 32(2):82-88.
13. Cavalcante DRB, Oliveira PS, Góis SM, Soares AF, Cardoso JC, Padilha FF, et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(3):278-84.
14. Faria PR, Chammas R, Melo TL, Hsu DK, Liu F, Nonogaki S, et al. Absence of galectin-3 does not affect the development of experimental tongue carcinomas in mice. *Exp Mol Pathol*. 2011; 90:189-193.
15. Tang X, Urvalek AM, Osei-Sarfo K, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Gene expression profiling signatures for the diagnosis and prevention of oral cavity carcinogenesis-genome-wide analysis using RNA-seq technology. *Oncotarget*. 2015; 6(27):24424-35.
16. Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW. ABT-510 Is an Effective Chemopreventive Agent in the Mouse 4-Nitroquinoline 1-Oxide Model of Oral Carcinogenesis. *Cancer Prev Res*. 2009; 2:385-393.
17. Barnes L, Evenson JW, Reichart P: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon; 2005.
18. Tang X, Urvalek AM, Osei-Sarfo K, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Gene expression profiling signatures for the diagnosis and prevention of oral cavity carcinogenesis-genome-wide analysis using RNA-seq technology. *Oncotarget*. 2015; 6(27):24424-35.

19. Gissi DB, Gabusi A, Servidio D, Cervellati F, Montebugnoli L. Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated with ki67 Antigen in Oral Leukoplakia: A Retrospective Longitudinal Study. *Open Dent J.* 2015; 9:41-45.
20. Dragomir LP, Simionescu C, Margaritescu CL, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(1):89–93.
21. Yagyuu T, Obayashi C, Ueyama Y, Takano M, Tanaka Y, Kawaguchi M, et al. Multivariate analyses of Ki-67, cytokeratin 13 and cytokeratin 17 in diagnosis and prognosis of oral precancerous lesions. *J Oral Pathol Med.* 2014; 44(7):523-31.
22. Babilio-de-Oliveira RP, Pannain VLN. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(22): 6924-6930.
23. Stockfleth E, Von Kiedrowski R, Dominicus R, Ryan J, Ellery A, Falqués M. Efficacy and safety of 5-fluorouracil 0.5%/salicylic acid 10% in the field-directed treatment of actinic keratosis: a phase iii, randomized, double-blind, vehicle-controlled trial. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13555-016-0161-2>.
24. Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Paderni C, Campisi G, et al. 5-Fluorouracil Buccal Tablets for Locoregional Chemotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Formulation, Drug Release and Histological Effects on Reconstituted Human Oral Epithelium and Porcine Buccal Mucosa. *Curr Drug Deliv.* 2010; 7:109-117.
25. Ledderhof NJ, Caminiti MF, Bradley G, Lam DK. Topical 5-Fluorouracil is a Novel Targeted Therapy for the Keratocystic Odontogenic Tumor. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 1-11.
26. Al-Barrag A, Al-Shaer M, Al-Matary N, Al-Hamdani M. 5-Fluorouracil for the treatment of intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the conjunctiva and cornea. *Clin Ophthalmol.* 2010; 4:801–808.
27. Islam MN, Kornberg L, Veenker E, Cohen DM, Bhattacharyya I. Anatomic Site Based Ploidy Analysis of Oral Premalignant Lesions. *Head Neck Pathol.* 2010. 4:10-14.
28. Wilkey JF, Buchberger G, Saucier K, Patel SM, Eisenberg E, Nakagawa H, et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Mol Carcinog.* 2009; 48(9):853-61.

29. Werschler WP. Considerations for Use of Fluorouracil Cream 0.5% for the Treatment of Actinic Keratosis in Elderly Patients. J Clin Aesthet Dermatol. 2008; 1(2):22-27.
30. Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. J Oral Sci. 2010; 52:13-21.

LISTA DE ABREVIACÕES

4-NQO: 4-nitroquinolona-1-óxido; 5-FU: 5-fluoruracil; UFPE: Universidade Federal de Pernambuco.

DECLARAÇÕES

Aprovação ética e consentimento do paciente

Pesquisa aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de processo: 23076.049868/2013-52

Consentimento para publicação

Não se aplica

Disponibilidade de dados e material

Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo publicado [e seus arquivos de informações suplementares].

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brasil).

Contribuição dos autores

JF concebeu este trabalho. GB conduziu os experimentos e escreveu o artigo. DE analisou os dados. Todos os autores aprovam a versão final deste manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

4 CONCLUSÃO

Os animais tratados com 5-FU 0,5% orabase apresentaram uma menor quantidade de células marcadas pelo Ki 67, com uma menor intensidade de coloração, indicando que houve uma menor proliferação celular nos animais tratados, confirmando que o 5-fluoruracil 0,5% em orabase poderá consistir em um recurso terapêutico eficaz no tratamento de lesões potencialmente malignas da cavidade oral.

REFERÊNCIAS

1. Tang X, Osei-Sarfo K, Urvalek AM, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Combination of bexarotene and the retinoid CD1530 reduces murine oral-cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(24): 8907–8912.
2. Ge L, Wu Y, Wu L, Zhang L, Xie B, Zeng X, et al. Case report of rapidly progressive proliferative verrucous leukoplakia and a proposal for aetiology in mainland China. *World J Surg Oncol*. 2011; 9:26-30.
3. Parker JB, Stivers JT. Dynamics of Uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochem*. 2011; 50(5):612–617.
4. Cavalcante DRB, Oliveira PS, Góis SM, Soares AF, Cardoso JC, Padilha FF, et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(3):278-84.
5. Faria PR, Chammas R, Melo TL, Hsu DK, Liu F, Nonogaki S, et al. Absence of galectin-3 does not affect the development of experimental tongue carcinomas in mice. *Exp Mol Pathol*. 2011; 90:189-193.
6. Costa GBF, Almeida ER, Cavalcanti FGB, Castro JFL. The effects of topical treatment with 5-fluorouracil on potentially malignant lesions of mice oral mucosa. *J Morphol Sci*. 2015; 32(2):82-88.
7. Henriques ACG, Cazal C, Lins RC, Castro JFL. Morphological Analysis of the Oral Mucosa of Rats Subjected to Experimental Carcinogenesis by Administration of Nitroquinoline Oxide (4NQO). *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2011; 11(1):13-20.
8. Rivera MCA. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. *Int J Morphol*. 2012; 30(1):309-314.
9. Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res*. 2011; 25(1):34-41.
10. Bascones-Martínez A, et al. Differences in the expression of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. *Oncol Lett*. 2012; 3:1319-1325.
11. Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncol*. 2012; 48:578–584.

12. Reddy VM, Kamath A, Radhakrishnan RA. p53 immunoprofiling of potentially malignant oral disorders: A case series analysis. *Indian J Cancer*. 2012; 49(1):27-32.
13. Tang X, Urvalek AM, Osei-Sarfo K, Zhang T, Scognamiglio T, Gudas LJ. Gene expression profiling signatures for the diagnosis and prevention of oral cavity carcinogenesis-genome-wide analysis using RNA-seq technology. *Oncotarget*. 2015; 6(27):24424-35.
14. Viswanathan V, Juluri R, Goel S, Madan J, Mitra SK, Gopalakrishnan D. Apoptotic Index and Proliferative Index in Premalignant and Malignant Squamous Cell Lesions of the Oral Cavity. *J Int Oral Health*. 2015; 7(1):40-43.
15. Kim C, et al. Prognostic role of p53 and Ki-67 immunohistochemical expression in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a retrospective study. *J Thorac Dis*. 2015; 7(5):822-833.
16. Yu J, Zhou Q, Zheng Y, Bao Y. Expression of Vimentin and Ki-67 Proteins in Cervical Squamous Cell Carcinoma and their Relationships with Clinicopathological Features. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16:4271-4275.
17. Birajdar SS, Radhika MB, Paremala K, Sudhakara M, Soumya M, Gadivan M. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 2014; 18(2): 169-176.
18. Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VLN. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(22): 6924-6930.
19. Dragomir LP, Simionescu C, Margaritescu CL, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53(1):89–93.
20. Yagyuu T, Obayashi C, Ueyama Y, Takano M, Tanaka Y, Kawaguchi M, et al. Multivariate analyses of Ki-67, cytokeratin 13 and cytokeratin 17 in diagnosis and prognosis of oral precancerous lesions. *J Oral Pathol Med*. 2014; 44(7):523-31.
21. Gissi DB, Gabusi A, Servidio D, Cervellati F, Montebugnoli L. Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated with ki67 Antigen in Oral Leukoplakia: A Retrospective Longitudinal Study. *Open Dent J*. 2015; 9:41-45.
22. Santos FD, Montovani J, Soares CT, Carvalho LR. Expression of p53 in the Tumor and Oral Epithelium in Patients with Cancer of Mouth and Pharynx. *Intl Arch Otorhinolaryngol*. 2011; 15(1):41-47.
23. Yamashita T, Kato K, Long NK, Makita H, Yonemoto K, Iida K, et al. Effects of smoking and alcohol consumption on 5-fluorouracil-related metabolic enzymes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2014; 2:429-434.

24. Kong X, et al. Analysis of plasma metabolic biomarkers in the development of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. *Oncol Lett.* 2015; 9:283-289.
25. Fong LYY, et al. Zinc supplementation suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2011; 32(4):554–560.
26. Fracalossi ACC, Silva MS, Oshima CTF, Ribeiro DA. Wnt/ β -catenin signalling pathway following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88(4):176–183.
27. Jiang Y, et al. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary calcium. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(4):3529-3542.
28. Wilkey JF, Buchberger G, Saucier K, Patel SM, Eisenberg E, Nakagawa H, et al. Cyclin D1 overexpression increases susceptibility to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced dysplasia and neoplasia in murine squamous oral epithelium. *Mol Carcinog.* 2009; 48(9):853-61.
29. Hasina R, Martin LE, Kasza K, Jones CL, Jalil A, Lingen MW. ABT-510 Is an Effective Chemopreventive Agent in the Mouse 4-Nitroquinoline 1-Oxide Model of Oral Carcinogenesis. *Cancer Prev Res.* 2009; 2:385-393.
30. Schoop RAL, Noteborn NHM, Jong RJB. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Hist.* 2009; 40:177-181.
31. Yeh CT, Chen HC, Sung CM, Hsu CL, Lin CC, Pan KT, et al. Retrospective comparison between a regular and a split-dose protocol of 5-fluorouracil, cisplatin, and mitoxantrone for the treatment of far advanced hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2011; 11:117-142.
32. Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically Guided Dose Adjustment of 5-Fluorouracil: A Rational Approach to Improving Therapeutic Outcomes. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:1543-1552.
33. Tong J, Xie G, He J, Li J, Pan F, Liang H. Synergistic Antitumor Effect of Dichloroacetate in Combination with 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:740564.
34. Iwahashi S, Ishibashi H, Utsunomiya T, Morine Y, Ochir TL, Hanaoka J, et al. Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines. *The J Med Invest.* 2011; 58:106-109.
35. Giannola LI, De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Paderni C, Campisi G, et al. 5-Fluorouracil Buccal Tablets for Locoregional Chemotherapy of Oral Squamous Cell Carcinoma: Formulation, Drug Release and Histological Effects on Reconstituted Human Oral Epithelium and Porcine Buccal Mucosa. *Curr Drug Deliv.* 2010; 7:109-117.

36. Stockfleth E, Von Kiedrowski R, Dominicus R, Ryan J, Ellery A, Falqués M. Efficacy and safety of 5-fluorouracil 0.5%/salicylic acid 10% in the field-directed treatment of actinic keratosis: a phase iii, randomized, double-blind, vehicle-controlled trial. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s13555-016-0161-2>.
37. Werschler WP. Considerations for Use of Fluorouracil Cream 0.5% for the Treatment of Actinic Keratosis in Elderly Patients. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2008; 1(2):22-27.
38. Al-Barrag A, Al-Shaer M, Al-Matary N, Al-Hamdani M. 5-Fluorouracil for the treatment of intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the conjunctiva and cornea. *Clin Ophthalmol*. 2010; 4:801–808.
39. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:301–313.
40. Barnes L, Evenson JW, Reichart P: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon; 2005.

ANEXO A – Normas da revista

JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH

CRITERIA

JECCR strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories. Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the Editorial Policies Page.

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section. Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be

searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below

- indicate the corresponding author

ABSTRACT

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- Background: the context and purpose of the study
- Methods: how the study was performed and statistical tests used
- Results: the main findings
- Conclusions: brief summary and potential implications
- Trial registration: If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our editorial policies for more information on trial registration

KEYWORDS

Three to ten keywords representing the main content of the article.

BACKGROUND

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

METHODS

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

RESULTS

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

DISCUSSION

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

CONCLUSIONS

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

LIST OF ABBREVIATIONS

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

DECLARATIONS

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our editorial policies for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our consent form if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our editorial policies for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available here.

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our editorial policies for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies.

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our editorial policies for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

ENDNOTES

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

REFERENCES

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal
Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)
Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R,

Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI
Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement
Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book
Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.
OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)
Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored
Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document
Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999.

Online database
Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage
Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site
 Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site
 Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site
 ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier
 Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

FIGURES, TABLES ADDITIONAL FILES

See General formatting guidelines for information on how to format figures, tables and additional files.

Submit your manuscript in Editorial Manager

ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 18 de dezembro de 2013.

Ofício nº 668/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª Gilliene Batista Ferreira da Costa**
Departamento de Odontologia CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.049868/2013-52

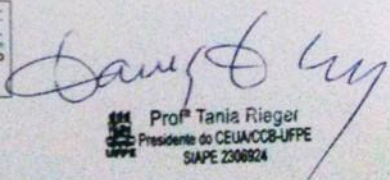
Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, *"Expressão Imuno-histoquímica do Ki67, P53 e timidilato sintase em lesões potencialmente malignas da mucosa lingual de camundongos tratados pelo 5-fluoruracila-orabase"*.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério de Antibióticos;
Camundongo Heterogênico; Linhagem: (mus músculos);
Idade: 08 semanas; Peso: 25 e 30g; Sexo: macho; Nº
Total de Animais: 72



Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SUAPE 2306824