

Research Article

Dietilstilbestrol (DES) Induction of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) In Female Neonatal Wistar Mice

Iting *, STIKes Nurul Hasanah Kutacane Aceh Tenggara,
Aceh.081376225119, E-mail: itingtea@yahoo.com,
S.Rahayu University Singaperbangsa Karawang, West Java 41 361, E-mail
sri.rahayu@staff.unsika.ac.id, (m): + 6281212831000

DES is a synthetic estrogen hormone that is useful as hormone replacement therapy, but ultimately DES can also support the growth of abnormal cells that will develop into cervical cancer. Cervical cancer related to the potential for invasive and metastatic where the gold standard is histopathological examination. In histopathological examination of cervical epithelial cells, abnormal cells or dysplasia cells can be found, and are classified using cervical intraepithelial neoplasia (CIN) stage. At stage CIN1 does not need therapy, 80% dysplasia cell can be returned to normal. CIN II & III can develop into cancer cells (a precursor of true cervical cancer). CIN is called pre-cancerous cells which if do not handled further will potentially transferred to be cancer. However, not all women who fix CIN will suffer cancer. The study used strains of female Wistar mice for 3-5 days in age, given a DES presentation of 1500 µgram / KgBB for 35 days. The results showed that the group that was given DES 100% succeeded in CIN with a 40% spread of Stage CIN2 and CIN3 and 20% CIN1. Control group 100% normal or without CIN. Chi square test results have a supportive effect between giving DES by increasing CIN with a value of $p < 0.05$,

Keywords: cervical cancer, CIN, DES, In Vivo, Neonatal,

Induksi Dietilstilbestrol (DES) Terhadap *Cervical Intraepithelial Neoplasia*
(CIN)

Pada Tikus Wistar *Neonatal* Betina

Iting *,STIKes Nurul Hasanah Kutacane Aceh
Tenggara,Aceh.081376225119, E-mail:itingtea@yahoo.com,
S.Rahayu Universitas Singaperbangsa Karawang 41361 Jawa Barat, E-mail
sri.rahayu@staff.unsika.ac.id,(m):+6281212831000

Abstrak

DES adalah hormon estrogen sintetis yang bermanfaat sebagai terapi sulih hormon, namun ternyata DES juga dapat memicu pertumbuhan sel abnormal pada epitel serviks yang akan berkembang menjadi kanker serviks. Kanker serviks berkaitan dengan potensi invasi dan metastasis dimana *gold* standarnya adalah pemeriksaan histopatologi. Pada pemeriksaan histopatologi sel epitel serviks dapat ditemukan sel abnormal atau displasia sel, dan digolongkan dengan menggunakan stadium *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). Pada stadium CIN1 tidak perlu terapi, 80% displasia sel dapat kembali normal. CIN II & III dapat berkembang menjadi sel kanker (true cervical cancers precursors). CIN disebut sebagai sel-sel pra kanker yang jika tidak ditangani lebih lanjut akan berpotensi menjadi kanker. Namun demikian tidak semua wanita yang mengalami CIN akan menderita kanker. Penelitian ini menggunakan tikus strain *Wistar* betina berumur 3-5 hari, yang diberikan

paparan DES dosis 1500 µgram/KgBB selama 35 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok yang diberikan DES 100% mengalami CIN dengan sebaran 40% Stadium CIN2 dan CIN3 serta 20% CIN1. Kelompok kontrol 100% normal atau tanpa CIN. Hasil uji *chi square* ada efek yang bermakna antara pemberian DES dengan terjadinya CIN dengan nilai $p < 0,05$,

Kata Kunci: CIN, DES, *in vivo*, stadium CIN, *Neonatal* betina,

1. Pendahuluan

Masalah kesehatan nasional saat ini mulai berubah dari penyakit menular ke penyakit tidak menular. Berdasarkan laporan WHO tahun 2015 lebih dari 528.000 ditemukan kasus kanker serviks baru dan lebih dari 80-90% ditemukan di negara berkembang. Kanker serviks merupakan kanker urutan kedua di dunia, pada tahun 2012 menyebabkan kematian hampir 266.000 wanita di dunia. Jumlah penderita kanker serviks diperkirakan akan meningkat 1-5 kali lipat pada tahun 2030. [1],[2],[3],[4],[5].

Kanker serviks 98% berkaitan dengan *Human Papilloma Viruse* (HPV). Infeksi HPV tidak semuanya berkembang menjadi kanker servik, hal ini mengindikasikan bahwa faktor endogen dan eksogen mempengaruhi proses terjadinya kanker servik.[3],[7]

Berbagai faktor resiko terjadinya kanker serviks diantaranya; sosio demografi; usia, status sosial ekonomi. Faktor aktivitas seksual; usia pertama kali melakukan hubungan seksual, pasangan seksual berganti-ganti. Selain itu,

infeksi klamidia, *immune suppression*, paritas ,kurang menjaga kebersihan genital, merokok, riwayat penyakit kelamin, riwayat keluarga penderita kanker serviks, trauma kronis serviks, kontrasepsi oral dan dietilstilbestrol (DES).^{[5],[7]}

DES adalah hormon estrogen sintetis yang bermanfaat sebagai terapi sulih hormon namun ternyata DES dapat memicu pertumbuhan sel abnormal yang akan berkembang menjadi kanker serviks.^{[8],[9]}

DES atau dietilstilbestrol merupakan sintesis dari estrogen atau *xenoestrogen*, mempunyai rumus kimia $C_{18}H_{20}O_2$. DES digunakan untuk mencegah keguguran atau persalinan prematur. Pada tahun 1946-1971 sekitar 2 hingga 4 juta individu terpapar DES selama kehamilannya. Wanita terekspos DES selama kehamilan menyebabkan gangguan yang disebut sebagai *DES daughters*. Pada *DES daughters* ditemukan abnormalitas saluran reproduksi berupa adenosis vagina dan serviks, diikuti berkembangnya epitel kolumnar pada serviks dan vagina. *DES daughters* mempunyai resiko dalam perkembangan *cervicovaginal clear cell-adenoma*. Adenosis serviko vaginal sebagai prekursor adenocarcinoma.^{[1],[10]}

Kanker serviks berkaitan dengan potensi invasi dan metastasis dimana *gold* standar pemeriksaannya dengan histopatologi.^{[1],[5],[10]}

Pada pemeriksaan histopatologi ditemukan displasia sel epitel serviks dengan standar stadium *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). CIN disebut sebagai sel-sel pra kanker yang jika tidak ditangani lebih lanjut akan berpotensi

menjadi kanker. Namun demikian tidak semua wanita yang memiliki CIN akan menderita kanker.

Gejala adanya CIN tidak spesifik, pemeriksaan CIN mengurangi resiko terjadinya kanker serviks. Diagnosis yang akurat dan prediksi adanya keganasan menjadi isu penting dalam manajemen klinik, termasuk identifikasi biomarker untuk diagnosis CIN itu sendiri.^[10]

Screening CIN merupakan metode efektif untuk mengidentifikasi adanya kanker lebih dini sehingga dapat menurunkan angka kematian. CIN yang telah dilakukan terapi dapat menyebabkan tumbuh kembali (recurent). Faktor usia, menopause, pasca pembedahan menjadi salah satu faktor rekuren CIN.^[11]

Pemeriksaan CIN dapat menurunkan insiden dan kematian akibat kanker, CIN dapat dideteksi dan ditangani segera.^[12] Penanganan pra kanker lebih efektif dan efisien serta rendah biaya sebelum berkembang menjadi sel kanker yang ganas.^{[1].^[13]}

Pada stadium CIN1 tidak perlu terapi, 80% displasia sel dapat kembali normal.^[9] CIN II & III diperlukan terapi seperti; laser, *cryoteraphy*, *LEEP (loop electrosurgical excision procedure)* dan laser *conization*. CIN II dan III dapat berkembang menjadi sel kanker (true cervical cancers precursors) dalam waktu 12 bulan .^{[1].^[9]}

Hampir 330.000 kasus CIN baru ditemukan di Eropa, 50% diantaranya CIN2 dan CIN3. Hasil penelitian 1.5 per 1000 wanita di negara berkembang

didiagnosa CIN2 dan CIN 3, insiden tertinggi antara usia 25 hingga 29 tahun yang merupakan usia produktif.^[12]

Screening CIN merupakan metode efektif mengidentifikasi adanya kanker lebih dini sehingga menurunkan angka kematian. Hasil berbagai penelitian di atas bahwa paparan DES mengakibatkan gangguan pada pertumbuhan sel abnormal. Berdasarkan uraian di atas akan dilakukan penelitian secara *in vivo* efek induksi dietilstilbestrol (DES) terhadap CIN pada tikus neonatal betina usia 3-5 hari.

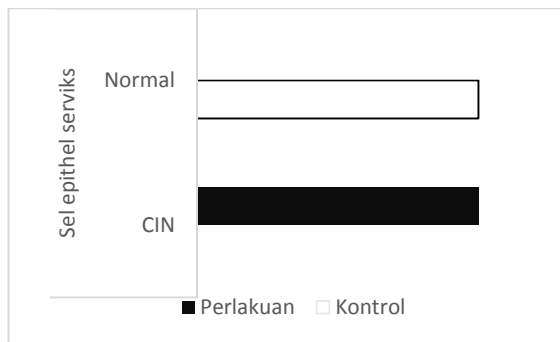
2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in vivo*. Penelitian menggunakan tikus strain Wistar betina berumur 3-5 hari, untuk menghindari adanya efek estrogen endogen.^[14] Dosis DES 1500 µgram/kg BB, untuk melihat adanya CIN.^[15] DES tersuspensi dalam larutan *corn oil* diberikan secara sub kutan.

Pada penelitian ini digunakan 10 ekor Wistar betina. Tikus baru lahir berusia 3-5 hari. Tikus dibagi 2 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif, tikus hanya diberikan plasebo berupa Na CMC 1%. Kelompok II, diberikan DES selama 35 hari, dosis 1500 µ gram/KgBB. Setelah paparan DES diberikan, kemudian tikus dimatikan dan diperiksa epitel serviks di observasi displasia sel epitel dan dikelompokkan stadium CIN pada masing2 kelompok, hasilnya dibandingkan kontrol.

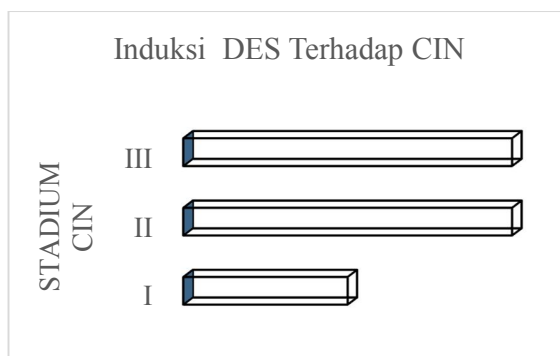
3. Hasil Penelitian

Tabel.1 distribusi frekuensi CIN pada 2 kelompok Tikus Wistar



Tabel 1. menunjukkan bahwa kelompok yang mendapat paparan DES atau kelompok perlakuan 100% mengalami *cervical intraepithelial Neoplasma* (CIN). Pada kelompok kontrol tidak satupun mengalami CIN atau sel epitel serviks normal.

Tabel.2 distribusi frekuensi CIN pada kelompok Tikus yang diberikan DES



Tabel 2. menggambarkan bahwa kelompok yang mendapat DES 100% mengalami *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). Sebaran CIN meliputi 40% Stadium CIN2 dan CIN3 serta 20% CIN 1. Hasil uji *Chi square* ada efek yang

bermakna antara pemberian DES dengan terjadinya CIN dengan nilai $p < 0,05$, artinya ada efek bermakna pemberian DES dengan terjadinya CIN atau pra kanker.

4. Pembahasan

Pada penelitian ini, pemberian DES 100% menyebabkan displasia epitel serviks (CIN) dan merangsang pembentukan sel abnormal meskipun sampel adalah tikus neonatal. Pembentukan sel abnormal pada epitel vagina kemungkinan karena DES meningkatkan protoonkogen: *c-Jun*, *c-fos* dan *c-ymc*, memicu terjadinya kanker.^[16]

DES menyebabkan displasia sel serviks.^[8] DES menyebabkan mutasi pada *p53 wild type*, hal ini menyebabkan penurunan pertahanan sel terhadap kanker.^[17] Estrogen menyebabkan kanker dengan dosis non fisiologis. Estrogen meningkatkan oksidatif dengan merusak DNA pada *estrogen-responsive tissues*.^[18]

Paparan DES menyebabkan genotoksik dan karsinogenesis. Paparan DES pada neonatus menyebabkan gen mengalami demetilasi atau hipometilasi yang menyebabkan DNA tidak stabil dan mudah rusak. Pada kromosom yang sedang *rearrangements*, DES menimbulkan potensi aneugenik, sehingga DNA binding protein menjadi rusak mengganggu regio satelit sentromer. Selain itu, DES juga menghambat *intra-chain crosslinking* di tubulin.

Estrogen merupakan hormon yang mempunyai potensi genotoksik, aksinya melalui metabolit estrogen yaitu *quinone*, akibat induksi oksidasi dan aldehid menghasilkan efek mutagenik pada *apurinic site* di DNA, yang menyebabkan peroksidasi lipid. DES juga menyebabkan kerusakan pada mitokondria khususnya menyerang sitokrom c oksidase.

DES menyebabkan kanker melalui kombinasi epigenetik dan genotoksik. Para ahli memastikan adanya agonis reseptor estrogen yang menstimulasi transkripsi dan proliferasi pada sel target. Adanya ikatan kuat antara nukleotida DNA dengan metabolit DES. DES meningkatkan DNA *adduct* atau disebut *I-compounds*, adanya generasi radikal bebas hingga mutasi p53 oleh DES. Efek DES akibat *DNA adduct* pada wanita 4-6 kali lipat lebih tinggi di banding pria.

[18]

DES bekerja dengan mengganggu neuroendokrin, melalui penganalasan *hormone gonadotrophin release hormone* (GnRH). DES akan menurunkan *kadar kiss peptin* mRNA atau menurunkan stimulasi GnRH di neuron yang dirangsang *kiss peptin*. *kiss peptin* merupakan regulator GnRH. Kiss peptin mengatur ovulasi, siklus estrus, diferensiasi sex dan mempengaruhi pubertas.^[15]

DES berkaitan dengan protein 63 (TRP63) yang tinggi ekspresinya di epitel squamosal serviks dan vagina, TRP63 mempengaruhi diferensiasi squamosal pada mullerian *Müllerian duct* (MDE). Pada saat lahir tidak ada TRP63 menyebabkan defek pada perkembangan kulit dan sistem reproduksi.

Paparan DES pada hewan coba ekspresi TRP 63 di MDE dihambat. Pada fase kritis DES menginduksi adenosis sehingga menyebabkan kegagalan diferensiasi squamosal MDE selama organogenesis pada sistem reproduksi wanita bagian bawah.^[19]

DES menurunkan regulasi Wnt7a pada uterus bayi baru lahir, termasuk diferensiasi miometrium, rendahnya kelenjar uterus dan metaplasia squamosa. Efek teratogenezis dari DES melalui penurunan regulasi Wnt7a. Mutasi pada Wnt7a mengubah ekspresi uterus, termasuk perkembangan regulator: Hoxa10 and Hoxa11, yang juga menurun regulasinya di uterus pada paparan DES saat neonatus. Gen tersebut berperan penting pada perkembangan reseptor estrogen α (ER α) .^[19] Berbagai jalur DES menyebabkan gangguan pada sistem reproduksi, tentunya diperlukan pengawasan penggunaan DES pada terapi sulih hormone, maupun penggunaan estrogen pada berbagai terapi.

Penelitian dengan pemeriksaan histologi penting memperhatikan adanya *human error* mengenai diagnose stadium CIN sehingga perlu peningkatan *skill* ataupun standar baku yang lebih objektif dan praktis serta modern untuk diagnose CIN.

5. Daftar Pustaka

- [1] WHO., Strategic framework for the comprehensive control of cancer cervix in South-East Asia Region.2015.

- [2] Ferlay .Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.(2015). Int. J. Cancer: 136, E359–E386
- [3] Tsikouras P.,*et al.* Cervical cancer: screening, diagnosis and staging JBUON 2016; 21(2): 320-325. Review Article
- [4] Kumar Naina.Cervical Cancer; a Nightmare for Womanhood: Review of Recent Advances ISSN: 2369-307X.2016 Journal: Women's Health & Gynecology Volume 2 • Issue 2
- [5] Ci Ali , NE Makata and Ezenduka POCervical Cancer: A Health Limiting Condition. Gynecol Obstet (Sunnyvale).2016. Volume 6 . Issue 5
- [6] B. Divya , Ashwini Nayak, Sridhar Honnappa Comparative study of P53 expression between inflammatory and mild dysplasia of cervical epithelium, Indian.2017.Journal of Obstetrics and Gynecology Research ;4(4):356-358
- [7] Gracy.G*, Sadhna.K, Jacqueline.J,. Deepika.K. Highlights Of P53 Mutation And It's Role In Cervical Cancer Metastasis. Int J Biol Med Res. 2014; 5(1): 3772-3779
- [8] Laronda Monica M.,*et al.*, The Development of Cervical and Vaginal Adenosis as a Result of Diethylstilbestrol Exposure In Utero. Differentiation. 2012. 84(3): 252–260

- [9] Yamashita.S, akayanagain A. dan Shimizu N. Effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on c-fos and c-jun protooncogene expression in the mouse uterus, *Histol Histopathol* 2001.16: 131 -140
- [10] Mitildzans,A., *et al.*,.Expression of p63, p53 and Ki-67 in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia .2017. doi: 10.5146/tjpath.2016.01373
- [11] Chun S, *et al.*The Neutrophil Lymphocyte Ratio Predicts Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Cancer* .2017.Vol. 8 8(12): 2205-2211.
- [12] Vegunta.S, *et al.*, Screening Women at High Risk for Cervical Cancer: Special Groups of Women Who Require More Frequent Screening. *Mayo Clin Proc.*2017. 92(8):1272-1277
- [13] Sing Niharika , Bannur Hema., A cross-sectional study of p53 expression in patients with squamous cell carcinoma cervix: A hospital-based study. *Indian Journal of Helath Sciences and Biomedical Research KLEU.*2018. Volume 10, Issue 2
- [14] Kurita Takeshi, A. Mills2 Alea and Cunha Gerald R. Roles of p63 in the diethylstilbestrol induced cervicovaginal adenosis. *Development and disease* 2013.131, 1639-1649
- [15] Yoshida M. *et al*, Delayed Adverse Effects of Neonatal Exposure to Diethylstilbestrol and Their Dose Dependency in Female Rats. *Toxicologic Pathology* (2011) 39: 823-834

- [16] Iguchi Taisen,¹ Yugo Fukazawa,¹ and Howard A. Bern. Effects of Sex Hormones on Oncogene Expression in the Vagina and on Development of Sexual Dimorphism of the Pelvis and Anococcygeus Muscle in the Mouse. *Environmental Health Perspectives* 79.1995
- [17] Carmichael LP., *et al.* Mechanisms of Hormonal Carcinogenesis in the p53^{+/+} Hemizygous Knockout Mouse: Studies With Diethylstilbestrol. *Toxicologic Pathology*, 2001.vol 29(Suppl.), pp 155–160
- [18] Fučić¹ A., *et al.*. Animal model for age- and sex-related genotoxicity of diethylstilbestrol. *Braz J Med Biol Res* ,2009.42(11).
- [19] Takeshi Kurita, Mills Alea A. dan R. Cunha Gerald. Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis. *Development* .2003.131, 1639-1649