



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

JULIANA JASPER

**AÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS CONFECCIONADAS
NA LÍNGUA DE RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA:
AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Porto Alegre
2016



JULIANA JASPER

**AÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS CONFECCIONADAS
NA LÍNGUA DE RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA:
AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA**

Linha de Pesquisa: Enfermidades da Região Bucomaxilofacial – Estudos
Clínicos, Imunológicos e Anátomo-Patológicos

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Concentração: Estomatologia
Clínica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo

Porto Alegre
2016

J39a

Jasper, Juliana

Ação do fator estimulador de colônias de granulócitos em úlceras traumáticas confeccionadas na língua de ratos submetidos à radioterapia: avaliação clínica e histológica. / Juliana Jasper. – Porto Alegre, 2016.

137 f.; il

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo

1. Odontologia. 2. Estomatologia Clínica. 3. Estomatites. 4. Radioterapia. 5. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. I. Figueiredo, Maria Antonia Zancanaro de . II. Título.

CDD 617.607

Ficha elaborada pela bibliotecária Anamaria Ferreira CRB 10/1494

RESUMO

A mucosite oral (MO) radioinduzida é um efeito colateral altamente debilitante, que afeta a quase totalidade dos indivíduos portadores de neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço, submetidos à radioterapia (RT). A gravidade desta injúria está diretamente relacionada a fatores pertinentes à terapia em si e às características individuais de cada paciente. Não há, até o momento, um protocolo padrão para o tratamento desta enfermidade. Sendo assim, o presente estudo objetivou analisar clínica e histologicamente a ação do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) em úlceras traumáticas confeccionadas na língua de ratos Wistar submetidos à RT. Os animais foram alocados randomicamente em quatro grupos distintos: 1) RT + úlcera traumática + Filgrastim; 2) RT + úlcera traumática + soro fisiológico; 3) sem RT + úlcera traumática + Filgrastim; 4) sem RT + úlcera traumática. O Filgrastim (r-metHuG-CSF), um G-CSF recombinante, foi injetado diariamente nos animais pela via subcutânea, iniciando um dia depois do protocolo único de irradiação (30 Gy), imediatamente após a confecção da úlcera traumática. Uma vez concluído o tempo experimental de sete dias, os animais foram eutanasiados e tiveram a língua excisada, processada e corada com hematoxilina e eosina (HE). A avaliação clínica diferiu significativamente entre todos os grupos quanto à presença e ao tamanho da úlcera traumática, além do grau de severidade da MO radioinduzida, entre os grupos irradiados. Os grupos tratados com Filgrastim, submetidos ou não à RT, apresentaram uma melhor performance neste quesito. Histologicamente, houve maior resposta inflamatória nos grupos não irradiados, sem diferença estatisticamente significativa entre a medicação estudada e os respectivos grupos controle. Baseado nos resultados clínicos encontrados, pode-se concluir que o uso do Filgrastim reduziu a manifestação e o grau de severidade da úlcera

confeccionada e da MO radioinduzida. Esta é uma doença de patogenia complexa, a qual necessita investigações mais detalhadas sobre o real papel do G-CSF no seu manejo, para que uma indicação formal do seu uso possa ser recomendada com esta finalidade.

Palavras-chave: estomatite, mucosite, radioterapia, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), neoplasias de cabeça e pescoço

SUMMARY

Radiation-induced oral mucositis (OM) is a highly debilitating side effect, which affects almost all patients with head and neck malignancies undergoing radiotherapy (RT). The severity of this injury is directly related to factors associated with the therapy itself and the individual characteristics of each patient. To date, there is no standard treatment protocol for this condition. Therefore, the present study aimed to evaluate clinically and histologically the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the healing of traumatic ulcers produced in the tongue of Wistar rats undergoing RT. The animals were randomly divided into 4 groups: 1) RT + traumatic ulcer + Filgrastim; 2) RT + traumatic ulcer + saline; 3) no RT + traumatic ulcer + Filgrastim; 4) no RT + traumatic ulcer. Filgrastim (r-metHuG-CSF), a recombinant G-CSF, was injected subcutaneously into the animals once daily, beginning 1 day after a single-dose radiation protocol (30 Gy), immediately after the traumatic ulcer was made. At the end of a 7-day experimental period, animals were euthanized and had their tongue surgically removed, processed, and stained with hematoxylin and eosin (HE). Clinically, all groups differed significantly in presence and size of traumatic ulcers, and the irradiated groups also differed significantly in severity of radiation-induced OM. Filgrastim-treated groups, submitted or not to RT, showed a better performance in this aspect. Histologically, there was an increased inflammatory response in the nonirradiated groups, with no statistically significant difference between the study drug and the respective control groups. Based on the present clinical results, we conclude that the use of Filgrastim reduced the manifestation and severity of trauma-induced ulcers and radiation-induced OM. This condition has a complex pathogenesis, which requires further detailed investigations on the actual

role of G-CSF in its management before a formal recommendation regarding its use for this purpose can be made.

Keywords: stomatitis, mucositis, radiotherapy, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), head and neck neoplasms

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. ARTIGO CIENTÍFICO 1 | 26 |
| ABSTRACT | 28 |
| INTRODUCTION | 29 |
| CLASSIFICATION, RISK FACTORS, AND IMPACT OF OM..... | 31 |
| COLONY-STIMULATING FACTORS | 33 |
| FILGRASTIM..... | 34 |
| EFFECT OF G-CSF ON OM | 36 |
| EXPANDED USES OF G-CSF | 39 |
| CONCLUSION..... | 40 |
| CONFLICT OF INTEREST STATEMENT | 42 |
| REFERENCES..... | 43 |
| 3. ARTIGO CIENTÍFICO 2 | 50 |
| ABSTRACT | 52 |
| INTRODUCTION..... | 53 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 55 |
| Animal model..... | 55 |
| Irradiation protocol..... | 56 |
| Anesthesia..... | 57 |
| Mechanically induced ulcers..... | 57 |
| Treatment delivery | 58 |
| Clinical evaluation | 58 |
| <i>Trauma-induced ulcer</i> | 58 |
| <i>Radiation-induced OM</i> | 59 |
| Euthanasia | 60 |
| Sample processing..... | 60 |
| Histologic evaluation | 60 |
| Statistical analysis | 61 |
| RESULTS..... | 62 |
| Clinical evaluation | 62 |
| <i>Trauma-induced ulcer</i> | 62 |
| <i>Radiation-induced OM</i> | 63 |
| Histologic evaluation | 64 |
| DISCUSSION | 64 |
| REFERENCES..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| FIGURES | 82 |
| 4. DISCUSSÃO COMPLEMENTAR | 89 |
| 5. CONCLUSÃO | 96 |
| REFERÊNCIAS | 98 |
| APÊNDICES | 104 |
| APÊNDICE A – Ficha de avaliação clínica da úlcera traumática | 104 |
| APÊNDICE B – Ficha de avaliação clínica da mucosite oral radioinduzida | 105 |
| APÊNDICE C – Ficha de avaliação histológica | 106 |
| APÊNDICE D – Alojamento e identificação dos animais..... | 107 |
| APÊNDICE E – Irradiação dos animais..... | 108 |
| APÊNDICE F – Vias de administração das substâncias | 109 |
| APÊNDICE G – Radiodermite nos grupos irradiados..... | 110 |
| ANEXOS | 112 |
| ANEXO A – Visão esquemática da hematopoiese | 112 |
| ANEXO B – Instruções aos autores (<i>Journal of Oral Pathology and Medicine</i>)..... | 113 |
| ANEXO C – Confirmação de submissão do artigo científico 1 (<i>Journal of Oral Pathology and Medicine</i>) | 123 |
| ANEXO D – Instruções aos autores (<i>Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology</i>) | 124 |
| ANEXO E – Confirmação de submissão do artigo científico 2 (<i>Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology</i>) | 134 |
| ANEXO F – Documento de aprovação do SIPESQ - PUCRS..... | 135 |
| ANEXO G – Documento de aprovação do CEUA - PUCRS..... | 136 |

1. INTRODUÇÃO

A radioterapia (RT) é uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas no manejo dos pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço. Por não ser seletiva, a radiação ionizante afeta tanto as células malignas quanto as sadias dos tecidos bucais e peribucais localizados no portal de radiação. Devido à sua alta atividade mitótica, a mucosa oral é um alvo constante dos regimes citotóxicos antineoplásicos. O tratamento radioterápico causa um dano direto ao DNA, resultando numa depleção celular progressiva (LEE *et al.*, 2007; SONIS, 2009; RABER-DURLACHER, ELAD, BARASCH, 2010; RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012). Embora menos visível, a mucotoxicidade oriunda da terapia oncológica comumente se estende ao longo de todo o trato gastrointestinal. O fácil acesso à cavidade bucal permite que esta seja uma “janela” de visualização do potencial de agressividade tissular encontrado em outras regiões do corpo do indivíduo (EILERS, MILLION, 2011).

A mucosite oral (MO) é um dos efeitos adversos mais comuns da RT em região de cabeça e pescoço, sendo causada pela ação localizada deste tratamento na mucosa oral. É definida como um processo inflamatório que se manifesta tipicamente como áreas atróficas, edemaciadas, eritematosas e ulceradas. Trata-se de uma condição debilitante que se instala, geralmente, após a terceira semana de terapia, com doses de radiação compreendidas entre 10 e 30 Gy e que apresenta graus de severidade variáveis (RABER-DURLACHER, ELAD, BARASCH, 2010; RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012; LALLA *et al.*, 2014a).

Queixas usuais dos pacientes incluem dor, xerostomia, alteração de sensibilidade e dificuldades funcionais. A MO interfere, invariavelmente, no conforto, na nutrição, na comunicação e no bem-estar geral do portador (EILERS, MILLION, 2011). Uma complicação muito comum desta condição, especialmente em indivíduos neutropênicos, é o aumento da predisposição a infecções, podendo colocar em risco a vida do paciente. Pacientes imunossuprimidos, cujas lesões ulceradas tornam-se infectadas, requerem maiores gastos com antibióticos, suporte nutricional e, conseqüentemente, maior tempo de internação hospitalar. A mucosite afeta a qualidade de vida e pode tornar-se um fator dose-limitante no tratamento, o que influencia negativamente o prognóstico da doença (EILERS, MILLION, 2011; RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012; LALLA *et al.*, 2014b). Esta é uma barreira

preocupante que resulta em problemas no combate ao câncer, pois a terapia frequentemente necessita ser adiada ou descontinuada, com comprometimento da sua eficácia e com a diminuição da resposta do paciente à mesma. Muitos estudos mostram que o seu abandono ou interrupção aumentam consideravelmente o risco de proliferação celular de tumores residuais, resultando na recorrência da doença (RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012; VISWANATH *et al.*, 2012).

Diferentes abordagens terapêuticas, que incluem a utilização de antimicrobianos, antiinflamatórios, substâncias citoprotetoras, fitoterápicos, fatores de crescimento e citocinas, suplementação nutricional, energia LASER de baixa potência, entre outros, tem sido investigadas no tratamento da mucosite radio e quimio-induzidas. Os mecanismos pelos quais o LASER promove seus efeitos benéficos ainda não são totalmente compreendidos, mas sabe-se que a fototerapia é capaz de modular diversos processos metabólicos através da absorção de energia pelos cromóforos celulares (MIGLIORATI *et al.*, 2013; LALLA *et al.*, 2014a).

Os fatores de crescimento são agentes considerados candidatos terapêuticos, visto que possuem um potencial estimulador no processo de reparação tecidual (RABER-DURLACHER *et al.*, 2013). Estes são constituídos de proteínas que se ligam a receptores específicos da membrana de células-alvo, induzindo o seu crescimento, a sua proliferação e diferenciação (VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006).

Os fatores estimuladores de colônias (CSF) são indutores específicos de crescimento hematopoiético, que agem sobre as unidades progenitoras da medula óssea, estimulando a formação de células sanguíneas maduras. O G-CSF atua sobre o desenvolvimento dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), estimulando também a melhora da função dos neutrófilos periféricos, incluindo aqueles presentes nos tecidos mucosos. Em pacientes oncológicos, esta substância é utilizada na reconstituição hematopoiética entre os ciclos de quimioterapia após transplante de medula óssea e na neutropenia febril (MASCARIN *et al.*, 1999; VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006). Os resultados positivos obtidos com o G-CSF, no tratamento da leucopenia induzida por quimioterapia, têm despertado a atenção para o seu possível potencial benéfico em pacientes tratados por RT. Todos os esforços devem ser feitos para evitar interrupções no regime de irradiação, o que pode afetar negativamente o controle local da doença (SCHNEIDER *et al.*, 1999).

O Filgrastim (r-metHu-G-CSF) é um estimulador de colônias de granulócitos produzido pela tecnologia do DNA recombinante, que utiliza bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas pela adição de um gene humano (KATANO *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1999). Sua administração em pacientes pós-transplante autólogo de medula óssea resultou no aumento significativo da contagem de neutrófilos orais e no decréscimo da severidade e duração da mucosite (LIESCHKE *et al.*, 1992). Avanços recentes no entendimento da farmacologia deste agente têm levado à imediata investigação do seu uso em outras áreas de interesse, tais como a neutropenia associada à AIDS e em úlceras de difícil cicatrização, como por exemplo, as infecções em pés de pacientes diabéticos (THROM, 2008).

Ensaio clínicos sugerem que a utilização do G-CSF produz um efeito benéfico na redução da incidência, severidade e duração da MO, o que pode ser explicado pela diminuição do período de neutropenia dos pacientes (KATANO *et al.*, 1995; KARTHAUS *et al.*, 1998; CRAWFORD *et al.*, 1999; TEJEDOR *et al.*, 2000; GABRILOVE, 2006; SU *et al.*, 2006; KEEFE *et al.*, 2007). Uma redução nas interrupções do tratamento radioterápico também foi observada (MASCARIN *et al.*, 1999). Além disso, este fator de crescimento parece promover a cicatrização tecidual nos casos de radiodermite, quando injetado na periferia das lesões cutâneas radio-induzidas (VISWANATH *et al.*, 2012).

Contudo, são necessários estudos adicionais com um bom delineamento para viabilizar uma melhor avaliação do real efeito deste agente biológico na MO (MASCARIN *et al.*, 1999; VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006). Variáveis pertinentes ao tratamento e escolha da amostra foram observadas nos ensaios clínicos supracitados. Tais diferenças - incluindo o tipo, a dose e o regime de medicação empregada, o sexo, a idade e as características individuais dos pacientes, bem como o tipo de câncer e a localização dos tumores - podem afetar a prevalência e a severidade da MO. Pesquisas com fortes evidências científicas nesta área ainda são limitadas, fazendo-se necessária a utilização de medidas padronizadas que resultem na minimização de possíveis vieses (RABER-DURLACHER, ELAD, BARASCH, 2010; EILERS, MILLION, 2011).

Muitos avanços relacionados à MO têm ocorrido nos últimos anos, incluindo um melhor entendimento da epidemiologia e da patobiologia desta condição. Encontrar um fármaco ou uma intervenção biológica efetiva não têm sido tarefa fácil. Até o presente momento, muitas estratégias de prevenção e manejo dos quadros

clínicos dos portadores já foram propostas. Porém, as evidências científicas ainda são insuficientes para a recomendação de diretrizes efetivas de tratamento (SONIS, 2009; LI, TROVATO, 2012).

Considerando-se o impacto da MO radioinduzida no paciente oncológico, a proposta deste estudo foi avaliar a resposta clínica e histológica da ação do G-CSF em úlceras traumáticas confeccionadas na língua de ratos submetidos à RT, utilizando-se medidas padronizadas de seleção de amostra, protocolo de irradiação, indução da MO, posologia da droga e tempos experimentais.

5. CONCLUSÃO

A história da MO é tão antiga quanto o surgimento da terapia antineoplásica e, atualmente, esta continua sendo uma das mais proeminentes e importantes toxicidades associadas à radio e quimioterapia.

Encontrar um recurso adequado para a sua prevenção e tratamento tem sido um problema de difícil resolução, o que pode ser atribuído à ineficiência dos produtos testados, às consequências de estudos mal delineados ou à falta de rigor na execução dos mesmos.

Diversos avanços relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica dos CSFs têm ocorrido nos últimos anos, melhorando sua ação nos casos onde o seu uso é indicado. A literatura mostra evidências de que o G-CSF pode ter um importante papel na resolução da MO e na cicatrização de úlceras crônicas, embora mais estudos sejam necessários para que haja uma recomendação formal neste aspecto. Ainda que seja improvável a descoberta de uma droga capaz de tratar todos os portadores, com diferentes características individuais, distintos tipos de câncer e de regimes medicamentosos, haverá de existir uma solução para cada caso ou para uma parcela desta população.

Baseado nos resultados clínicos encontrados no presente estudo e na comparação com a literatura disponível, foi observado que a administração subcutânea do Filgrastim reduziu a manifestação e o grau de severidade da MO radioinduzida. Entretanto, investigações mais detalhadas a respeito do real mecanismo de ação do G-CSF na MO precisam ser desenvolvidas, visto que o sucesso deste agente biológico depende da dose utilizada, da via e do regime de administração eleitos. Além disso, a ausência da estimulação tumoral seguida da utilização de citocinas e de fatores de crescimento deverá ser confirmada em estudos de acompanhamento a longo prazo. Quanto mais se conhece a respeito da patobiologia da MO e do papel que estes agentes exercem neste intrincado processo, mais poderá ser explorado em relação à intervenção nos caminhos biológicos envolvidos no desenvolvimento deste efeito colateral tão debilitante do tratamento antineoplásico.