

TÂNIA CRISTINA BENETTI SOARES

***AVALIAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES EM
PACIENTES COM A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O
HOSPEDEIRO CRÔNICA: ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO
DAS CLASSIFICAÇÕES DE HORN E SHULMAN***

CAMPINAS

2008

TÂNIA CRISTINA BENETTI SOARES

***AVALIAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES MENORES EM
PACIENTES COM A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O
HOSPEDEIRO CRÔNICA: ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO
DAS CLASSIFICAÇÕES DE HORN E SHULMAN***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, Área de Concentração Ciências
Biomédicas.*

ORIENTADORA: Prof. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA

CO-ORIENTADORA: Dra. MARIA ELVIRA PIZZIGATTI CORREA

CAMPINAS

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So11a	Soares, Tânia Cristina Benetti Avaliação das glândulas salivares menores em pacientes com a doença do enxerto contra o hospedeiro crônica: estudo clínico-patológico das classificações de Horn e Shulman / Tânia Cristina Benetti Soares. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientadores : Maria Letícia Cintra, Maria Elvira Pizzigatti Correa Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Glândulas salivares. 2. Histopatologia. I. Cintra, Maria Letícia. II. Correa, Maria Elvira Pizzigatti. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Título em inglês : Histopathological evaluation of minor salivary glands in chronic Graft-versus-Host Disease after BMT – A comparative study between the Horn and Shulman's classifications with clinical correlation

Keywords: • Salivary glands
• Histopathology

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Letícia Cintra
Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves
Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Data da defesa: 28 -08 - 2008

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Maria Leticia Cintra

Membros:

1. Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

2. Prof. Dr. Jacks Jorge Junior

3. Profa. Dra. Maria Leticia Cintra

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data:
28/08/2008

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor, Jesus Cristo que me capacitou e me sustentou para realizar este trabalho;

Aos meus pais, José Benetti e Vera Lúcia pelo incentivo e infinito apoio;

À minha irmã, Fabrícia pela paciência;

Ao meu marido, Roberto pelo amor, compreensão e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Letícia Cintra, pela confiança depositada em mim oferecendo a oportunidade de realizar este trabalho. Pela disposição e paciência em me ensinar e pela pessoa altruísta que é.

À Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa, por acreditar em meu potencial, pelos ensinamentos, pela ajuda constante e por sua personalidade acolhedora, que incentiva seus alunos a realizarem o melhor.

Aos professores do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/ UNICAMP, em especial o Dr. Konradin Metze, pelos ensinamentos e ajuda.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão financeira que viabilizou a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/ UNICAMP, pela ajuda e paciência.

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade e incessante ajuda.

“Confia no Senhor de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento”

Provérbios 3:5

“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento; pois melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata, e sua renda do que o ouro.”

Provérbios 3: 13,14

DEUS

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xvi</i>
ABSTRACT.....	<i>xviii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	20
1.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro.....	23
1.1.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda.....	25
1.1.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.....	26
a) Fatores de risco para DECH crônica.....	28
b) Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral.....	29
1.2- Justificativa do trabalho.....	36
2- OBJETIVOS.....	37
2.1- Objetivo Geral.....	38
2.2- Objetivos Específicos.....	38
3- PACIENTES E MÉTODOS.....	39
3.1- Estudo histológico.....	40
3.2- Estudo imunohistoquímico.....	50
4-RESULTADOS.....	53
4.1- Classificação de Shulman et al.....	55
4.2- Classificação de Horn et al.....	58
5- DISCUSSÃO.....	60
6- CONCLUSÃO.....	65
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

8- APÊNDICES.....	76
8.1- Tabela 1: Características Clínicas.....	77
8.2- Tabela 4: Avaliação das amostras segundo a classificação de Shulman et al.....	79
8.3- Tabela 5: Avaliação das amostras segundo a classificação de Horn et al.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anemia aplástica
Alo-TCTH	Transplante de células tronco hematopoéticas alogênicas
APC	Antigen presenting cell
DAB	diaminobenzidina-HCl
DBx	Dia (pós transplante de medula óssea) da coleta da biópsia
DECH	Doença do Enxerto contra o hospedeiro
DECHc	Doença do Enxerto contra o hospedeiro crônica
F	Feminino
GSM	Glândula Salivar Menor
H&E	Hematoxilina & Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human leucocyte antigen</i>)
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
ICT	Irradiação corpórea total
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLC	Leucemia linfóide crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
M	Masculino
MHC	Major Histocompatibility Complex
MO	Medula óssea
SMD	Síndrome mielodisplásica

SP	Sangue Periférico
TMO	Transplante de medula óssea

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1 Características clínicas.....	77
Tabela 2 Associação do diagnóstico obtido a partir das classificações de Horn et al. e Shulman et al.....	48
Tabela 3 Características clínicas dos pacientes da amostra.....	54
Tabela 4 Avaliação das amostras segundo a classificação de Shulman et al..	79
Tabela 5 Avaliação das amostras segundo a classificação de Horn et al.....	81
Tabela 6 Distribuição do diagnóstico obtido através das classificações de Horn e Shulman.....	59

LISTA DE QUADROS

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1 Classificação clínica da DECHc.....	27
Quadro 2 Graduação histológica da GVHDc da glândula salivar, de acordo com Horn et al.....	34
Quadro 3 Critérios histológicos para avaliação de glândulas salivares menores segundo Shulman et al.....	35
Quadro 4 Categorias para o diagnóstico final de acordo com Shulman et al.	35

	PÁG.
Figura 1 DECHc: mucocelos e ulcerações em palato duro.....	30
Figura 2 DECHc liquenóide em dorso e ventre de língua.....	31
Figura 3 DECHc liquenóide atrófica em língua com lesões ulceradas em mucosa do dorso e borda lingual.....	32
Figura 4 DECHc liquenóide em mucosa jugal.....	32
Figura 5 Corte histológico que ilustra a classificação de Horn et al. grau 1	41
Figura 6 Corte histológico que ilustra a classificação de Horn et al. grau 2	42
Figura 7 Corte histológico que ilustra a classificação de Horn et al. grau 3	42
Figura 8 Corte histológico que ilustra a classificação de Horn et al. grau 4	43
Figura 9 Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar infiltrado inflamatório misto periductal e, na seta, linfócitos migrando no ducto. (H&E, aumento original x400).....	43
Figura 10 Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar linfócitos migrando para os ácinos (seta). (H&E, aumento original x400).....	44
Figura 11 Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar fibrose periductal indicada pela seta. (H&E, aumento original x100).....	44
Figura 12 Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar metaplasia oncocítica (H&E, aumento original x400).....	45
Figura 13 Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar infiltrado inflamatório crônico misto (H&E, aumento original x400).....	45

Figura 14	Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar células apoptóticas no epitélio ductal (H&E, aumento original x400).....	46
Figura 15	Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível notar a ausência de ácinos, dilatação ductal e fibrose intersticial (H&E, aumento original x100).....	46
Figura 16	Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar a perda da polaridade das células ductais (H&E, aumento original x400).....	47
Figura 17	Corte histológico de glândula salivar menor corada pelo Tricrômio de Masson: seleção da luz dos ductos através do uso do software Imagelab 2000. (aumento original x100).....	49
Figura 18	Corte histológico de glândula salivar menor corada pelo Tricrômio de Masson: seleção dos lóbulos glandulares através do uso do software Imagelab 2000. (aumento original x40).....	49
Figura 19	Corte histológico de glândula salivar menor imuno-marcada pelo CD45. A seta mostra a presença de linfócitos imuno-marcados na região peri-ductal e migrando no epitélio ductal. (aumento original x400).....	51

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1 Sobrevida global em relação a positividade ou não do critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto”.....	56
Gráfico 2 Relação entre o número de ductos com exocitose (contagem objetiva) e o critério subjetivo (presente ou não) “linfócitos periductais com exocitose nos ductos”.....	57
Gráfico 3 Relação entre a situação final dos pacientes com DECHc e o número de ductos com exocitose de linfócitos.....	58



RESUMO

O estabelecimento de critérios mínimos para o diagnóstico da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc), identificando aqueles com significância prognóstica, bem como a padronização deste achados, pode adicionar subsídios para a conduta terapêutica, facilitar o trabalho de pesquisadores e aperfeiçoar a comunicação entre eles. O objetivo deste trabalho foi estudar dois sistemas de classificação histológica para DECHc em glândulas salivares menores (GSM), um proposto por Horn et al. em 1995 que tem sido empregado no Departamento de Anatomia Patológica, UNICAMP, e outro proposto por Shulman et al. em 2006. Este foi um trabalho retrospectivo que avaliou biópsias de GSM coletadas no momento do diagnóstico clínico de DECHc oral. As amostras de GSM foram obtidas de pacientes tratados por transplante de medula óssea (TMO) convencional, com enxerto HLA- idêntico de doadores aparentados entre 1994 e 2006. Do total de 154 pacientes com DECHc oral, 65 amostras de GSM de 65 pacientes foram selecionadas. A mediana de idade dos pacientes foi de 36 (12 – 59 anos), sendo 39 homens e 26 mulheres. As doenças de base foram LMC (n = 37), LMA (n = 11) LLA (n = 8), AA (n = 6), HPN (n = 1) e SMD (n = 2). As fontes de células tronco para os TMOs foram sangue periférico (n = 28) e medula óssea (n = 37). As biópsias foram avaliadas segundo os sistemas de classificação de Horn et al. e Shulman et al. de forma cega e independente por duas observadoras, e o resultado de consenso foi considerado para análise estatística. Foi encontrada uma significativa correlação entre os diagnósticos histológicos propostos por Horn et al. e Shulman et al. ($R = 87\%$, $p = 0,0001$). O critério “linfócitos periductais com exocitose nos ductos”, da classificação de Shulman et al., mostrou correlação com a sobrevida global do paciente ($p = 0,007$). Assim, a migração de linfócitos através do epitélio ductal pode exercer influência negativa na evolução clínica dos pacientes. “Infiltrado linfocítico periductal” no sistema de graduação de Horn et al. mostrou correlação significativa com a forma clínica (localizada ou extensa) da DECHc ($p = 0,04$). Os resultados deste estudo apontam para a importância prognóstica adversa dos critérios “infiltrado linfocítico periductal” e “linfócitos periductais com exocitose nos ductos” e podem auxiliar no entendimento da DECHc oral.



ABSTRACT

Establishing minimum criteria for cGVHD diagnosis, identifying those with prognostic significance, as well as standardizing these features, may add subsidies to conduct therapy, to facilitate the work of researchers and to improve communication between them. The goal of this work was to study two systems for cGVHD histological classification in minor salivary glands (MSG), one proposed by Horn in 1995 that has been used at the Pathology Department, UNICAMP, and another one proposed by Shulman et al., in 2006. It was a retrospective study including MSG biopsies collected at the diagnosis of oral cGVHD. The MSG samples were obtained from patients treated by conventional HSCT, from HLA matched- sibling donors between 1994 - 2006. Among 154 patients with oral cGVHD, 65 samples were selected from 65 patients. Patients median age was 36 (12 – 59 years), 39 males and 26 females. The underlying diseases were CML (n = 37), AML (n = 11), ALL (n = 8), SAA (n = 6), PNH (n = 1) and MDS (n = 2). The sources of HSCT used were bone marrow (n = 37) and peripheral blood (n = 28). The histopathological specimens were blindly and independently examined by two observers and consensus results were considered for statistical processing. A significant correlation was found between the histological grades proposed by Horn and Shulman ($R = 87\%$, $p = 0.0001$). The criterium “Periductal lymphocytic infiltrate with exocytosis into duct”, in Shulman’s classification, was correlated with global survival ($p = 0,007$). “Peri-ductal lymphocyte infiltrate” in Horn’s system showed significant correlation with the clinical cGVHD form (localized or extensive) of cGVHD ($p = 0.04$). The results suggested similarity between final diagnoses obtained either by Horn or Shulman’s classification. The periductal lymphocytic infiltrate was the most important histological criterium for clinical form of cGVHD. The lymphocytes migration through ductal epithelium might exert negative influence in patient outcome. The findings point to the adverse prognostic significance of the following criteria: “periductal lymphocytic infiltrate” and “peri-ductal lymphocytic infiltrate with exocytosis into duct” and may improve the understanding of oral cGVHD.



1- INTRODUÇÃO

O Transplante de Medula Óssea (TMO) é o transplante de células hematopoiéticas pluripotenciais. Ele pode ser usado para tratar defeitos adquiridos do sistema hematopoiético ou do sistema imune, já que ambos os sistemas se desenvolvem a partir de uma célula indiferenciada comum (Abbas e Lichtman, 2005; Schaffer, 2006). É o tratamento de escolha para vários tipos de leucemias, linfomas, síndromes de falência da medula óssea e imunodeficiências (Woo et al., 1997).

Avanços críticos ocorreram no campo do TMO com a identificação dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLAs do inglês *human leukocyte antigens*) e o reconhecimento da importância da relação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC do inglês *major histocompatibility complex*) entre os tecidos do doador e do receptor (Woo et al., 1997).

Existem diferentes tipos de TMO, com o qual o paciente pode ser tratado; eles diferem entre si segundo: 1- a forma de obtenção das células a serem transplantadas, 2- o doador destas células e 3- o tratamento dado à medula a ser transplantada.

1- As células a serem transplantadas podem ser obtidas da medula óssea através de múltiplas punções da crista ilíaca do doador (Weiden et al. 1984), do sangue periférico em que células-tronco (células progenitoras) periféricas são obtidas (Anasetti 2004) e do sangue de placenta ou cordão umbilical (Cohen e Nagler, 2004).

2- Quanto ao doador das células hematopoiéticas, os transplantes podem ser singênicos ou isólogos, quando o doador é um irmão gêmeo univitelínico, geneticamente idêntico ao receptor; alogênico ou homólogo aparentado quando o doador é um irmão geneticamente compatível, que tenha herdado os mesmos cromossomos que determinam o MHC dos seus genitores. Este irmão terá, contudo, diferentes outros antígenos de histocompatibilidade, cujos loci genéticos estão em outros pares de cromossomos. Estes antígenos, em que pese serem denominados antígenos de histocompatibilidade menores, podem determinar a rejeição do enxerto e até a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) fatal. A medula de um indivíduo não aparentado também pode ser enxertada, desde que seja compatível para, pelo menos, um haplotipo (cromossomo). O sucesso e a rapidez da enxertia estão, entre outros fatores, diretamente relacionados ao grau de

histocompatibilidade entre o doador e o hospedeiro; e autólogo, quando a medula doadora foi obtida do próprio receptor, nestas situações, parte da medula óssea de um doente é removida e estocada, segue-se terapia com altas doses de quimioterápicos, associada ou não à irradiação corpórea total e a medula é, então, novamente infundida no doente (Weiden et al 1984).

3- A medula a ser enxertada pode ser tratada de várias formas como, por exemplo, com a depleção de células T, sob técnicas imunológicas ou farmacológicas. Transplante de medula que sofreu depleção de células T cursa com maior risco de falha na enxertia, recidiva da doença de base e infecções oportunistas (Jankowski e Ildstad 1997).

Precedendo o transplante de medula óssea são realizados regimes de condicionamento. O condicionamento consiste da administração de altas doses de quimioterápicos (Weiden et al 1984), associados ou não à irradiação corpórea total em alguns casos (Ferrara et al. 1996), para erradicação das células linfo-hematopoiéticas do hospedeiro, incluindo as neoplásicas.

Seja qual for a modalidade do condicionamento a ser instituída, a medula óssea dos pacientes, no momento do transplante, habitualmente já se encontra modificada pela doença de base, bem como em consequência das várias formas de tratamento instituídas. Este regime irá destruir o que restou da função medular. Os diferentes regimes de condicionamento mieloablativos são tóxicos, sendo a mucosite oral o efeito imediato mais grave e importante causa de morbidade nestes doentes (Demarosi et al., 2002). Outras complicações, particularmente quando incluem irradiação corpórea total (ICT), compreendem doença veno-oclusiva hepática, pneumonite intersticial, distúrbios endócrinos, ósseos e neurológicos tardios e do crescimento de crianças, catarata, tumores secundários e alopecia (Belkacemi et al., 1999).

A quimio-radioterapia age diretamente nos vasos e nas células em geral, desmascarando antígenos ocultos e desbalanceando a resposta imune, com a produção de células T citotóxicas autoimunes, explicando reações similares à DECH nos transplantes autólogos ou singênicos (Vogelsang e Wagner, 1990).

Danos às células precursoras (subpopulações seletivamente mais vulneráveis) podem produzir aneuploidia. As atipias nucleares em diferentes tecidos podem ser observadas anos após o TMO (Shulman e Sale 1984).

Nas últimas décadas, regimes de condicionamento não mieloablativos, de menor intensidade (TMO “mini-alo”), têm sido empregados, visando reduzir a sua toxicidade e, assim, permitir o TMO nos indivíduos mais enfermos ou idosos. O objetivo não é erradicar o tecido neoplásico ao máximo, mas determinar suficiente imunossupressão para permitir a enxertia da medula doadora e, assim, induzir o efeito enxerto-versus-leucemia (Shimoni e Nagler, 2004). Há indicações específicas para esta modalidade de TMO e, também, complicações peculiares (Mohty et al., 2000).

1.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro

A Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), a maior complicação do transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH), é uma síndrome com muitas manifestações clínicas, patológicas e imunológicas (Nicolau-Galitis, et al., 2001). A frequência em que tem se manifestado vem aumentando, provavelmente devido ao aumento de pacientes que sobrevivem às primeiras complicações do transplante, ao aumento no uso de doadores HLA incompatíveis e não aparentados e ao uso de sangue periférico como fonte de células tronco hematopoéticas (Akpek et al., 2001).

Barnes e Loutit foram os primeiros a relatar a reação do enxerto contra o hospedeiro após o transplante alogênico de medula óssea em 1955, e o nome Doença do enxerto contra o hospedeiro foi usado pela primeira vez por Cohen et al em 1957, introduzindo o conceito de que tal condição vinha do reconhecimento de antígenos do hospedeiro pelo enxerto (Volgelsang e Wagner, 1990).

Santos e Cole (1958) demonstraram que os linfócitos T eram a causa da DECH e que sua gravidade aumentava proporcionalmente com o número de células linfocitárias infundidas. Na mesma época era descoberta a área de histocompatibilidade em ratos (sistema H-2) primeiro e após, em humanos (sistema HLA).

Em 1966, Billingham formulou três condições, as quais deveriam estar presentes para ocorrer o desenvolvimento da DECH (Billingham, 1966-1967):

1. O tecido transplantado deveria conter células imunocompetentes.
2. O receptor deveria ser incapaz de rejeitar as células transplantadas.
3. O receptor deveria expressar antígenos teciduais que fossem diferentes daqueles do doador, o que permitiria às células doadas reconhecer os tecidos do receptor como estranhos.

Os linfócitos T maduros são as células imunocompetentes do enxerto que preenchem a primeira condição. Quando se realiza o condicionamento pré-transplante, através de quimioterapia com ou sem irradiação corpórea total, obtém-se então a imunossupressão necessária para prevenir a rejeição das células infundidas pelo receptor. Por outro lado, preenche-se também a segunda condição para o desenvolvimento de DECH. A terceira condição ocorre quando há expressão de antígenos teciduais do receptor que não estão presentes no doador. O complexo de histocompatibilidade maior (MHC do inglês *major histocompatibility Complex*) diferente entre doador e receptor é o mais importante fator de risco para a indução de DECH. Em adição, há os antígenos de histocompatibilidade menores derivados da expressão de genes polimórficos que poderão preencher a terceira condição, mesmo quando o enxerto for HLA compatível (Ferrara e Reddy, 2006; Woo et al., 1997).

Embora se pensasse classicamente que a DECH, seria causada pela diferença de histocompatibilidade entre doador e receptor como foi postulado por Billingham na década de 60, estudos realizados revelam que a DECH pode ocorrer em pacientes que receberam medula óssea autóloga ou singênica (enxerto de medula óssea de gêmeo idêntico) (Sloane et al., 1980; Hood et al., 1987). O mecanismo provável da DECH autóloga/ singênica é a falha dos mecanismos de deleção clonal no timo e desbalanceamento provocado pelo condicionamento. Acredita-se que a deleção clonal das células T auto-reativas é o principal mecanismo na prevenção do desenvolvimento da autoagressão (Sloane et al., 1980; Hood et al., 1987; Hess e Thoburn, 1997).

A DECH tem sido tradicionalmente classificada segundo o tempo que leva para o aparecimento de suas manifestações clínicas em aguda quando ocorre nos primeiros 100 dias pós-transplante e crônica quando ocorre após os 100 primeiros dias pós-transplante (Ferrara e Reddy, 2006).

Esta simples classificação tem se mostrado cada vez mais insatisfatória. Isto devido a novas situações clínicas do TMO, por exemplo, o regime de condicionamento pré-transplante de menor intensidade (TMO “mini-alo”) vem sendo amplamente aceito e as manifestações clínicas da DECH aguda, nestes casos, ocorrem muitas vezes mais tarde podendo ultrapassar a marca de 100 dias (Ferrara e Reddy, 2006).

1.1.1- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda

O termo DECH aguda descreve uma síndrome característica de dermatite, hepatite e enterite desenvolvida nos 100 primeiros dias após transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (Horwitz e Sullivan, 2006).

Krensky et al. (1990), classificaram as etapas para o desenvolvimento da DECH aguda em fase aferente, quando as células de destruição tecidual proliferam e são ativadas; eferente, quando ocorrem danos aos órgãos. Outros autores, no entanto classificaram-nas em três fases: 1. Dano tecidual do receptor causado pelo regime de condicionamento (quimioterapia e/ ou radioterapia pré-transplante); 2. Ativação e expansão clonal das células T do doador; 3. Dano tissular do hospedeiro por fatores celulares e inflamatórios (Ferrara e Reddy, 2006).

Na primeira fase, o regime de condicionamento causa os danos e leva à ativação das células apresentadoras de antígenos do receptor. Esta fase começa antes das células do enxerto serem infundidas. Os danos teciduais do receptor prévios ao TMO dependem de vários fatores como: o tratamento da própria doença, infecções e as drogas ou radiação provenientes do regime de condicionamento. As altas doses de quimioterapia ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs do inglês *antigens presenting cells*) do receptor que são críticas na estimulação das células T infundidas do doador com o

enxerto (Ferrara e Reddy, 2006). A irradiação corpórea total é bastante importante neste processo, pois ativa a secreção de citocinas inflamatórias do receptor, tais como interleucina 1 e fator de necrose tumoral- α , que induzem à apoptose endotelial e leva a danos do epitélio do trato gastrointestinal (Hill et al, 1997).

Na segunda fase as APCs do receptor apresentam os alo-antígenos para as células T do enxerto, as ativam e elas proliferam e secretam citocinas, incluindo interleucina 2 e interferon- γ (Ferrara e Reddy, 2006).

Por último, fagócitos mononucleares e neutrófilos causam inflamação, através da produção de mediadores como lipopolissacarídeos que exsudam através de danos na mucosa intestinal durante a fase 1. Assim, a etiofisiologia da DECH aguda culmina na terceira fase com a geração de múltiplos fatores de injúria citotóxicos aos órgãos alvo, incluindo várias citocinas inflamatórias, linfócitos T citotóxicos e células *natural killer* específicas contra o receptor. (Ferrara e Reddy, 2006).

Os órgãos alvo primários são: a pele, fígado e trato gastro-intestinal. Com base na observação clínica destes órgãos é possível graduar a DECH aguda entre 0 a IV segundo o acometimento destes órgãos. Os graus I ou II estão associados com menor morbidade e mortalidade, enquanto o grau IV leva, em quase 100% dos casos ao óbito (Woo et al, 1997).

1.1.2- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

A DECH crônica é definida como aquela que ocorre após 100 dias do transplante de medula óssea. Quando evolui da DECH aguda é chamada de **progressiva**, quando há a cura da DECH aguda e então ocorre a DECH crônica é chamada de **quiescente** e, finalmente, quando não é precedida pela DECH aguda é chamada **de novo** (Sullivan et al., 1981).

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica tem um efeito significativo na qualidade de vida e na mortalidade tardia dos pacientes que são tratados com o TMO

(Greinix et al., 2007), ela é a principal causa de morbidade e mortalidade não relacionada à recaída do paciente à doença de base (Nagler e Nagler, 2004).

Clinicamente, a mais comum classificação ainda em uso estratifica a DECHc em localizada e extensa (Quadro 1). Ela é baseada num estudo clínico e patológico de 20 pacientes, publicado há mais de duas décadas (Shulman et al., 1980). Pacientes que desenvolvem a forma localizada da doença apresentam curso favorável sem tratamento; já os pacientes que desenvolvem a forma extensa apresentam uma história natural não favorável sendo necessário tratamento imunossupressor sistêmico (Sullivan et al, 1980).

Quadro 1. Classificação clínica da DECHc

DECHc Limitada
Ocorrência de um ou ambos os eventos: 1. Acometimento localizado da pele 2. Disfunção hepática devida à DECHc
DECHc Extensa
Ocorrência do evento: 1. Acometimento generalizado de pele ou : 2. Acometimento localizado da pele e/ou disfunção hepática devida à DECHc mais : a. Histologia do fígado mostrando hepatite crônica agressiva, pontes de necrose ou cirrose; ou b. Acometimento dos olhos; ou c. Acometimento das glândulas salivares menores ou mucosa oral demonstrada por biópsia; ou d. Acometimento de qualquer outro órgão alvo

A DECH crônica mimetiza doenças auto-imunes atingindo múltiplos órgãos e suas manifestações clínicas são polimórficas com variações de gravidade e curso clínico (Greinix et al, 2007).

Alguns estudos demonstraram associação entre a DECHc e prejuízos à qualidade de vida e prejuízos da condição geral do paciente (Chiodi et al, 2000; Kiss et al, 2002; Fraser et al, 2006), e ainda a relação entre a gravidade da DECHc e o aumento da mortalidade relacionada ao seu tratamento. Pacientes com DECHc limitada, de baixa gravidade têm apresentado sobrevida igual ou maior quando comparados aos pacientes que não a desenvolveram. Isto se deve ao efeito anti-tumor da DECHc limitada, bem como ao fato de que estes pacientes não necessitam de tratamento sistêmico ou, pelo menos, não necessitam de tratamento de longa duração, o qual representa um fator agravante (Lee et al, 2002).

Os primeiros órgãos a serem afetados pela DECHc são a pele, fígado, boca e o trato gastrointestinal. Outros órgãos também podem ser acometidos, como o intestino delgado, pulmões, músculos e serosas (Nakamura et al, 1996; Jacobson et al, 2001; Flowers et al, 2002; Treister et al, 2005; Schaffer, 2006).

A alo-reatividade é a base da patogênese da DECH crônica. Células T alo-reativas maduras derivadas do doador, que foram transplantadas com as células tronco têm papel importante na DECH aguda e também na crônica (Horwitz e Sullivan, 2006).

Histologicamente, de forma geral, é observado aumento na deposição de colágeno nos órgãos alvo e área de infiltração de linfócitos T (Shulman et al., 1978).

Muitos pacientes com DECH crônica têm evidência de desregulação de células B com alta prevalência de anticorpos para vários antígenos de superfície celular e intracelular, porém o papel destes anticorpos não é claro (Quaranta et al., 1999).

a) Fatores de risco para a DECH crônica

Apesar da melhora da prevenção da DECH aguda, não houve concomitante diminuição da incidência da forma crônica.

A taxa de desenvolvimento da DECH crônica tem aumentado devido às alterações na prática clínica do TMO alogênico, a saber: 1- tratamento de pacientes cada vez mais velhos, com o TMO; 2- utilização de doadores não aparentados, ou aparentados

com HLA não idêntico; 3- a infusão de linfócitos para tratamento de recidivas de doenças onco-hematológicas; ou 4- após TMO “mini-alo” e finalmente 5- transplantes alogênicos com células precursoras periféricas (Vogelsang, 2001; Remberger et al., 2002; Baird e Pavletic, 2006; Teshima et al, 2008).

As taxas de incidência da DECHc relatadas variam de 6% à 80% segundo as diversas condições descritas acima (Greinix et al, 2007).

Entre pacientes que receberam medula HLA idêntico e que sobreviveram além de 150 dias pós-transplante, Sullivan et al. (1991) relata probabilidade de desenvolvimento de DECH crônica de 13% em crianças com menos de 10 anos, 28% em adolescentes entre 10 a 19 anos e 42 a 46% em adultos acima de 20 anos. Nagler R. e Nagler A. (2004) relatam variação de 25 a 45% na incidência de DECHc após TMO com doadores aparentados e um aumento para 40 a 70% em transplantes não aparentados.

Quanto à origem de células hematopoiéticas pode também haver diferença no risco de desenvolvimento de DECH crônica. Células obtidas do sangue do cordão umbilical estão associadas à baixa taxa de DECH crônica (Thomson et al, 2000). No transplante alogênico de células tronco do sangue periférico há controvérsias quanto ao risco aumentado da ocorrência de DECH crônica. Alguns estudos relatam incidência maior e de mais difícil controle (Storek et al, 1997; Flowers et al., 2002). Por outro lado existem também estudos que comparam o uso do enxerto de células periféricas com medula óssea e mostram que não há diferença nas taxas de DECH crônica (Bensinger et al, 2001).

b) Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica oral

O acometimento da cavidade bucal varia de 56% a mais de 70%, sendo que 100% dos pacientes que desenvolveram DECHc apresentam alterações histológicas das glândulas salivares menores (GSM) e 77% da mucosa oral (Soares et al, 2005). Os sintomas bucais apresentam-se em aproximadamente 80% dos pacientes na forma extensa da DECHc (Sullivan et al.1981). As alterações orais têm sido descritas como sendo um dos primeiros sinais a serem observados no desenvolvimento da DECHc e ainda, em comparação com

outros órgãos afetados , ser o local que melhor reflete o *status* da doença (Nakamura et al, 1996 e Nakhleh et al., 1989).

O acometimento oral inclui a mucosa e as glândulas salivares. Clinicamente, podem ser observados atrofia, eritema com evolução para ulcerações, mucocelos, mucosites e lesões liquenóides da mucosa bucal associados a sintomas como boca seca, maior sensibilidade a alimentos ácidos ou condimentados e crescente dor (Figuras 1, 2, 3 e 4)(Schubert et al., 1984; Woo et al, 1997).



Figura 1: DECHc: mucocelos e ulcerações em palato duro.



Figura 2. DECHc liquenóide em dorso e ventre de língua.



Figura 3. DECHc liquenóide atrófica em língua com lesões ulceradas em mucosa do dorso e borda lingual.



Figura 4. DECHc liquenóide em mucosa jugal

As alterações da mucosa incluem atrofia epitelial, corpos apoptóticos, degeneração hidrópica das células basais e infiltrado linfocitário subepitelial, o qual pode ser esparsos devido ao uso de drogas imunossupressoras (Sale et al., 1981; Nakhleh et al., 1989; Hiroki et al., 1994; Woo et al., 1997).

Os achados histológicos típicos na DECH crônica das glândulas salivares consistem no infiltrado linfocitário difuso e periductal, alterações estas similares às encontradas em pacientes com síndrome de Sjögren (Nakamura et al., 1996). São observados infiltração linfocítica ou linfoplasmocíticas, ambas intralobulares e periductais, ductos excretores maiores com danos celulares mais pronunciados e até necrose do epitélio ductal, resultando então na obstrução e finalmente dano acinar e fibrose intersticial (Sale et al., 1981; Nakhleh et al., 1989; Hiroki et al., 1994). O infiltrado linfocitário de glândulas salivares menores é, principalmente de células T CD3⁺, com leve predomínio de células CD8⁺ sobre as CD4⁺ (Hiroki et al., 1994; Soares et al., 2005)

Alterações inflamatórias periductais têm sido vistas também em outros órgãos exócrinos tais como pâncreas e glândulas lacrimais (Sale et al., 1981). Conforme anteriormente mencionado, na DECHc, as células linfóides enxertadas formam uma resposta imune contra antígenos teciduais do receptor, esta resposta imune é primariamente contra os antígenos do complexo de histocompatibilidade que são ricamente expressos no epitélio ductal, caracterizando os danos observados nestas estruturas (Lamey et al., 2004).

O acometimento da cavidade bucal é freqüentemente a fonte primária de morbidade e de significativo impacto na qualidade de vida do paciente (Treister et al., 2008). A diminuição do fluxo salivar leva a cáries dentais, infecções graves por *Cândida sp.* Adicionalmente, processos de esclerose cutânea (vinculados à DECHc) podem restringir gravemente a abertura bucal. A dor oral e sensibilidade a muitos alimentos e bebidas são comuns e não estão limitadas a pacientes com ulcerações. Estes desconfortos estão intimamente ligados à dificuldade na fala e à deglutição com conseqüente perda de peso destes pacientes com acometimento oral (Imanguli et al., 2006).

Atualmente no Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP é empregada, para o diagnóstico da DECHc, em glândulas salivares menores, a classificação

proposta por Horn et al. em 1995. Trata-se de um sistema de graduação histológica que busca definir critérios para o diagnóstico da DECHc, bem como refletir o estágio da doença. Baseia-se no grau de infiltração linfocítica, valorizando a destruição acinar e consequente fibrose intersticial. Os graus histológicos variam de 1 a 4 (Quadro 2) (Horn et al, 1995); nas Figuras 5, 6, 7 e 8 são vistos cortes histológicos de glândulas salivares menores que ilustram os achados dos diferentes graus da classificação de Horn et al.

Quadro 2. Graduação histológica da DECHc da glândula salivar, de acordo com Horn et al.

Grau	Achados Histológicos
1	Inflamação intersticial suave.
2	Destruição acinar leve, dilatação ductal, metaplasia escamosa, acúmulo de muco, fibrose leve, proliferação de células ductais, infiltrado linfocítico periductal, acúmulo mucoso.
3	Infiltrado linfocítico intersticial marcado, destruição difusa de ductos e ácinos.
4	Perda praticamente completa de ácinos, dilatação ductal marcada, fibrose intersticial com ou sem inflamação.

Recentemente houve a formação de grupos de trabalho para o desenvolvimento de um projeto de consenso em critérios para diagnóstico clínico da doença do enxerto contra o hospedeiro. Estes grupos publicaram trabalhos nos quais foram discutidos temas como o diagnóstico histopatológico, biomarcadores, critérios de resposta, cuidados de suporte e avaliação clínica na tentativa de promover a uniformização dos critérios de diagnóstico e avaliação da DECHc (Filipovich et al, 2005; Couriel et al, 2006; Martin et al, 2006; Pavletic et al, 2006b; Schultz et al, 2006; Shulman et al, 2006).

Shulman et al (2006), propôs uma nova classificação, apenas para o diagnóstico histopatológico de diversos órgãos acometidos pela DECHc. Nas GSMs são empregados parâmetros dicotômicos (Quadro 3) que contemplam os achados histológicos ilustrados nas

Figuras de 9 a 16. Os critérios mínimos para o diagnóstico são presença de linfócitos periductais, linfócitos em exocitose em ductos ou ácinos e fibrose periductal. O diagnóstico final inclui as seguintes categorias: sem DECH, possível DECH, consistente com DECH e DECH conforme está disposto na Quadro 4.

Quadro 3. Critérios histológicos para avaliação de glândulas Salivares menores segundo Shulman et al.

	Sim	Não		Sim	Não
Linfócitos periductais APENAS em exocitose no ducto			Infiltrado crônico misto periductal		
Linfócitos (apenas) ao redor e migrando para os ácinos			Células apoptóticas em ductos/ácinos		
Fibrose periductal			Degeneração acinar/ fibrose intersticial/ ectasia ductal		
Metaplasia Oncocítica (apenas em crianças)			Perda da polaridade das células do epitélio ductal		

Quadro 4. Categorias para o diagnóstico final de acordo com Shulman et al.

Categoria		Definição
0	Sem DECH	Nenhuma evidência para DECH
1	Possível DECH	Evidências para DECH, mas com outras possíveis explicações
2	Consistente com DECH	Evidência clara de DECH com fatores mitigantes
3	DECH	Evidência contundente de DECH e nenhum outro comentário necessário

1.2- Justificativa do trabalho

Apesar de bem conhecida a magnitude do problema determinado pela DECHc, houve poucas mudanças nos índices de morbidade e mortalidade associados a ela na última década. Existem algumas razões para isto e, certamente, uma delas é o entendimento incompleto da biologia da DECHc e a falta de um sistema de classificação adequado e bem validado que permita definir o estágio da doença e avaliar sua resposta ao tratamento (Fraser e Baker, 2007).

A biópsia da mucosa do lábio inferior tem se mostrado de grande valor para o diagnóstico para a DECHc (Nakamura et al, 1996; Schubert e Sullivan, 1990; Nicolatou-Galatis et al, 2001). Jacobson et al (2001) demonstraram ainda que a biópsia é fundamental na confirmação do diagnóstico clínico do paciente já que muitos sintomas clínicos da DECHc são similares aos de outras doenças. Isso diminui as chances de tratamento desnecessário e, portanto, diminui também a morbidade causada por ele.



2- OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Nosso objetivo foi avaliar o significado biológico dos critérios e graus/diagnósticos de dois sistemas de classificação para glândulas salivares menores em pacientes que desenvolveram a doença do enxerto contra o hospedeiro crônica após transplante de medula óssea, o primeiro, proposto por Horn et al, 1995 e o segundo proposto por Shulman et al, 2006.

2. Objetivos específicos

- Correlacionar os graus obtidos na classificação de Horn com os diagnósticos de Shulman.
- Correlacionar o diagnóstico final obtido em cada uma das classificações com a sobrevida dos pacientes e a forma clínica (localizada ou extensa) da doença.
- Correlacionar cada um dos critérios histológicos que compõe as duas classificações com a sobrevida e forma clínica da doença.



3- PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo é uma análise retrospectiva de pacientes que foram tratados com transplante de medula óssea no período de 1994 até 2006.

Os arquivos da unidade de transplante de medula óssea da UNICAMP foram pesquisados e através deles foram obtidos os registros de todos os pacientes que, neste período de doze anos foram tratados com o TMO alogênico totalizando 364 pacientes. Todos estes pacientes receberam enxertos HLA idênticos, de doadores aparentados e sistema ABO compatível. Foram selecionados 245 pacientes que desenvolveram DECH crônica oral e de quem haviam sido coletadas biópsias do lábio inferior para a confirmação do diagnóstico, destes, 132 pacientes tinham biópsias com GSM representadas.

Os blocos de parafina contendo o material de biópsia foram recuperados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP. Os pacientes cujos blocos não foram localizados ou que não continham material suficiente para as análises das glândulas salivares menores foram excluídos do estudo. Ao final da seleção, do total de 132 pacientes, participaram do estudo 65 pacientes com 65 amostras.

As biópsias foram realizadas na data em que a doença foi clinicamente diagnosticada. Elas foram obtidas do lábio inferior a 10mm da comissura labial e a 10 mm do fórnice vestibular ou no local com sinais clínicos da DECHc. Sob anestesia local infiltrativa, foi usado *punch* nº 4 (Stieffel, Alemanha). Este material foi fixado em solução de formol tamponado a 10% e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP.

Os dados clínicos dos pacientes em estudo estão discriminados na Tabela 1 do Apêndice.

3.1- Estudo histológico

As amostras foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e Tricrômio de Masson, examinadas de forma cega e independente por dois observadores e o resultado de consenso foi considerado para análise estatística. Cada uma das lâminas coradas com H&E foram examinadas de acordo com a graduação de Horn et al. (Quadro 2) para glândulas salivares (as Figuras 5, 6, 7, e 8 trazem os achados que caracterizam cada um dos graus da

forma como foram considerados na avaliação), e após, segundo a classificação de Shulman et al. para GSM (Quadros 3 e 4). Os achados histológicos observados nas Figuras de 9 a 16 correspondem aos achados que caracterizam cada um dos critérios descritos no Quadro 3, da forma como foram considerados na avaliação.

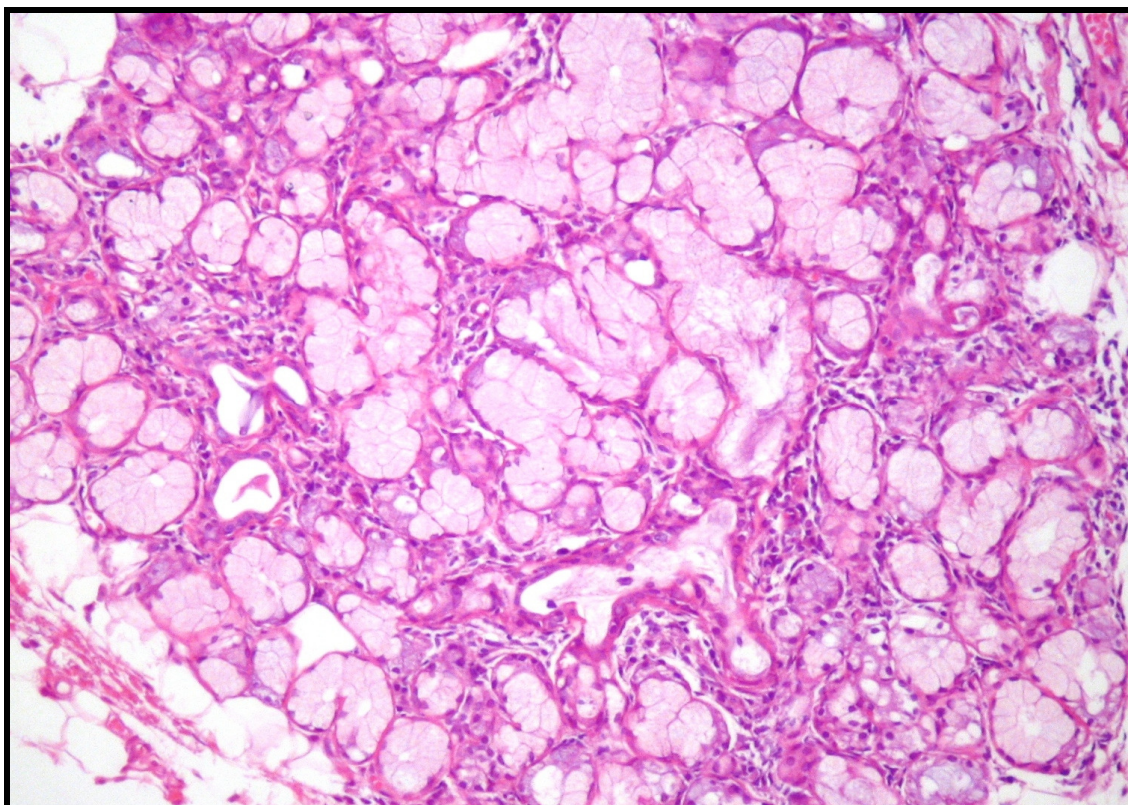


Figura 5. Corte histológico de glândulas salivar menor (paciente 41) que ilustra a classificação de Horn et al. grau 1.

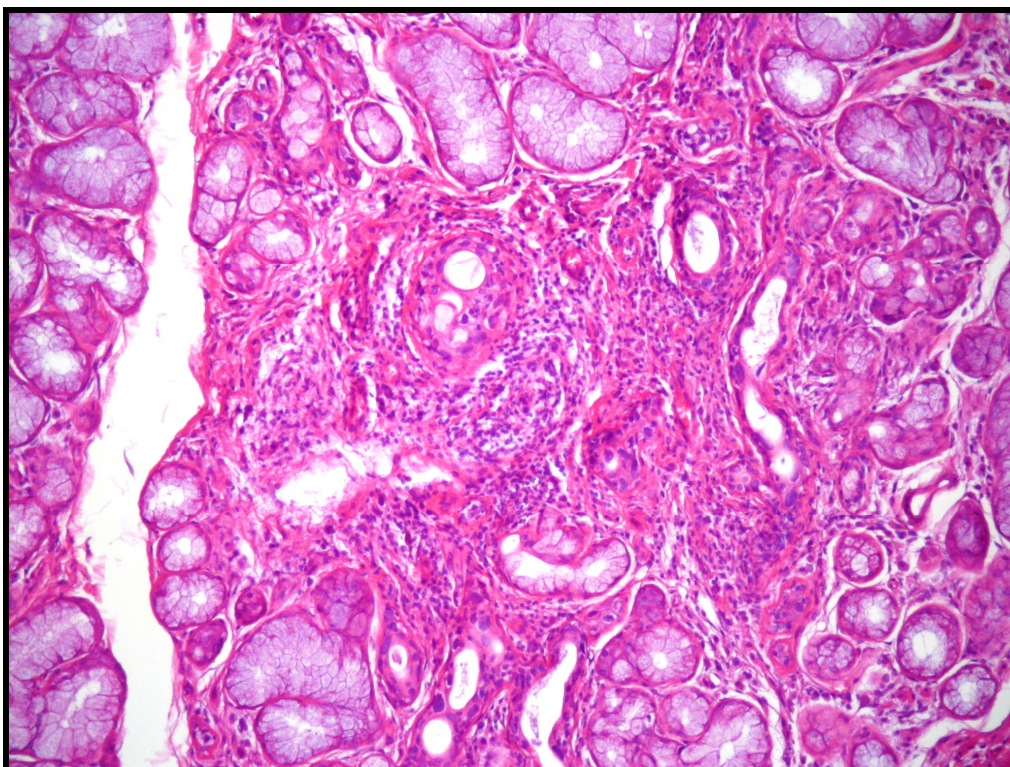


Figura 6. Corte histológico de glândulas salivar menor (paciente 37) que ilustra a classificação de Horn et al.grau 2.

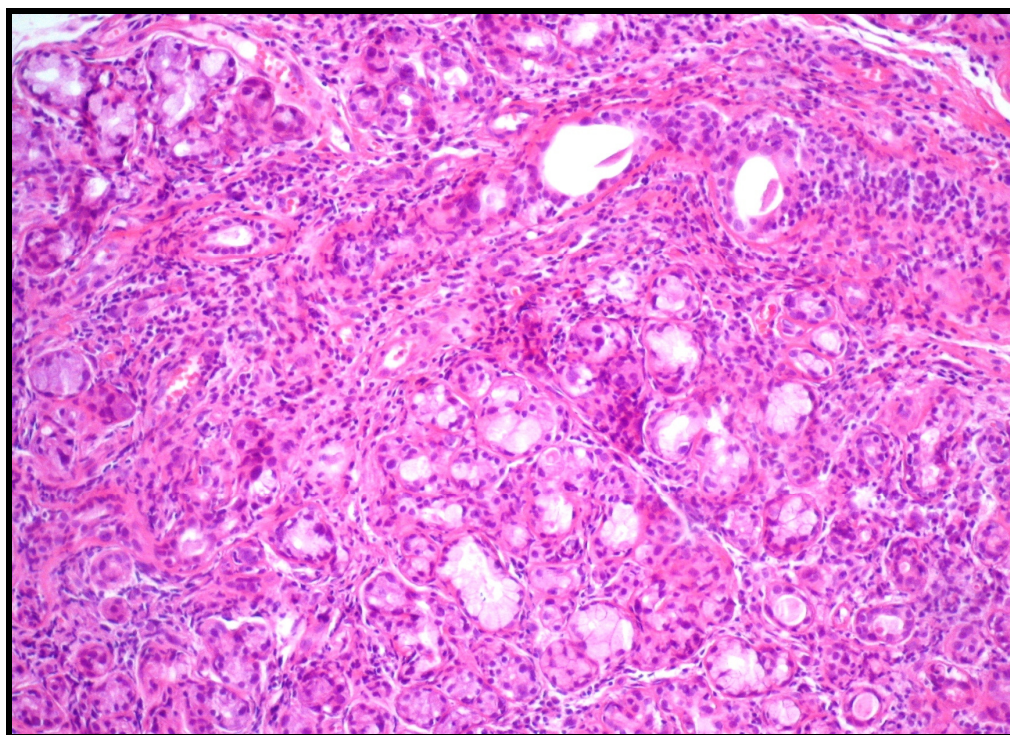


Figura 7. Corte histológico de glândulas salivar menor que ilustra a classificação de Horn et al.grau 3.

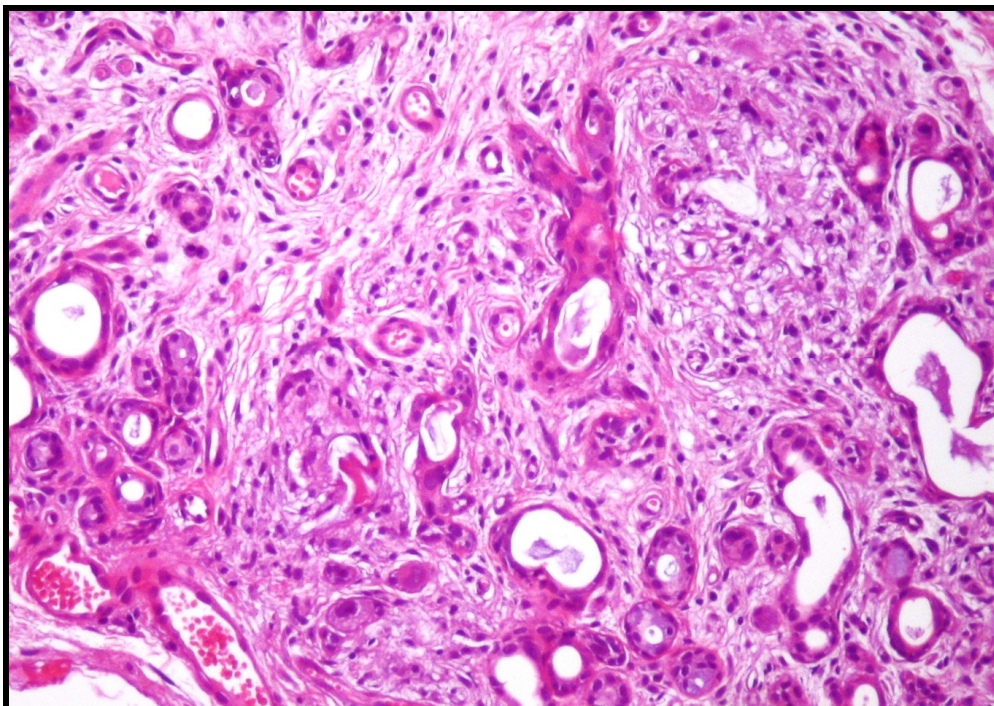


Figura 8. Corte histológico de glândulas salivar menor (paciente 54) que ilustra a classificação de Horn et al. grau 4.

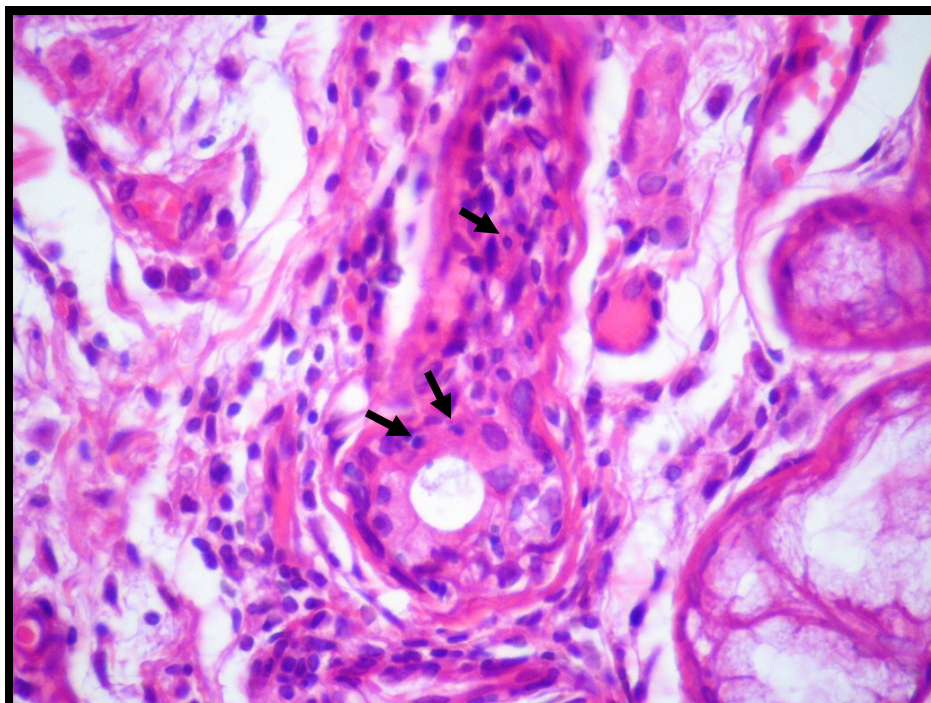


Figura 9: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 61) onde é possível observar infiltrado inflamatório misto periductal e, na seta, linfócitos migrando no ducto. (H&E, aumento original x400)

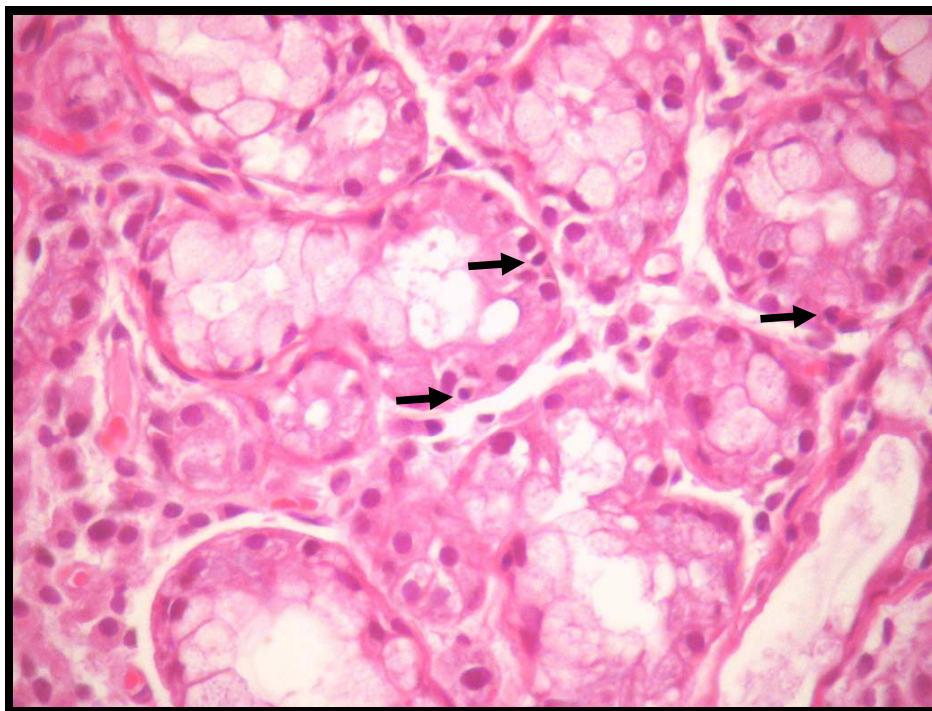


Figura 10: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 63) onde é possível observar linfócitos migrando para os ácinos (seta). (H&E, aumento original x400).

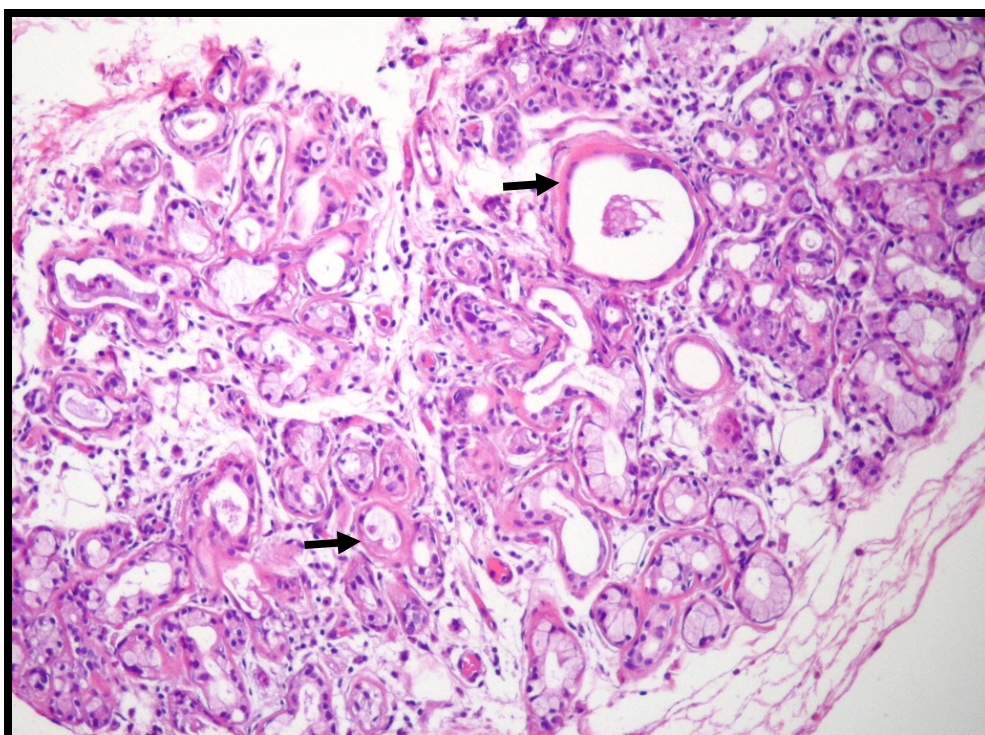


Figura 11: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 47) onde é possível observar fibrose periductal indicada pela seta. (H&E, aumento original x100).

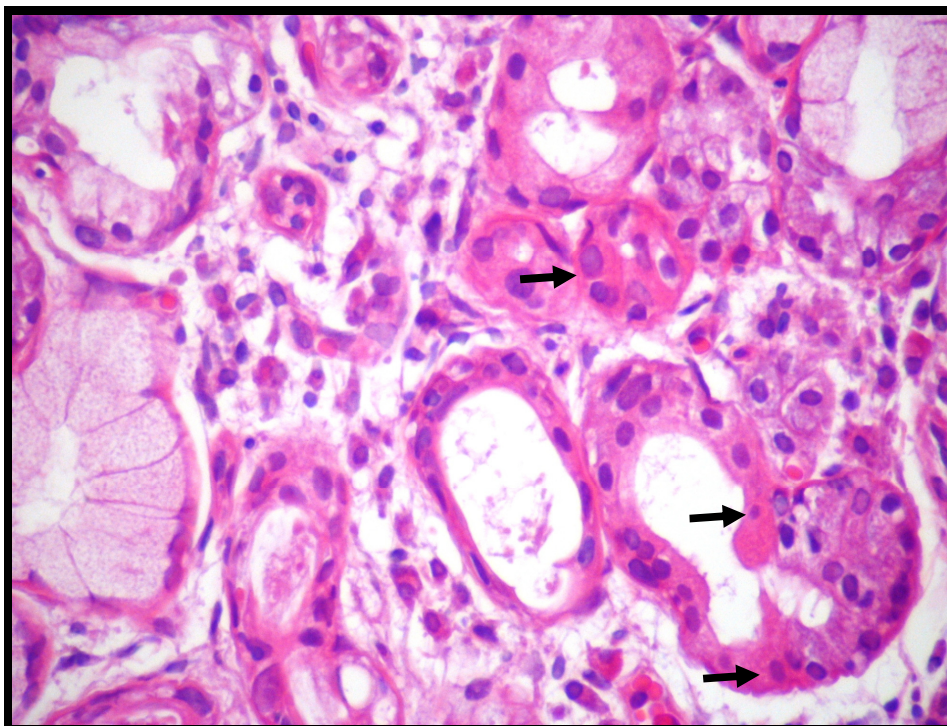


Figura 12: Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar metaplasia oncocítica (H&E, aumento original x400).

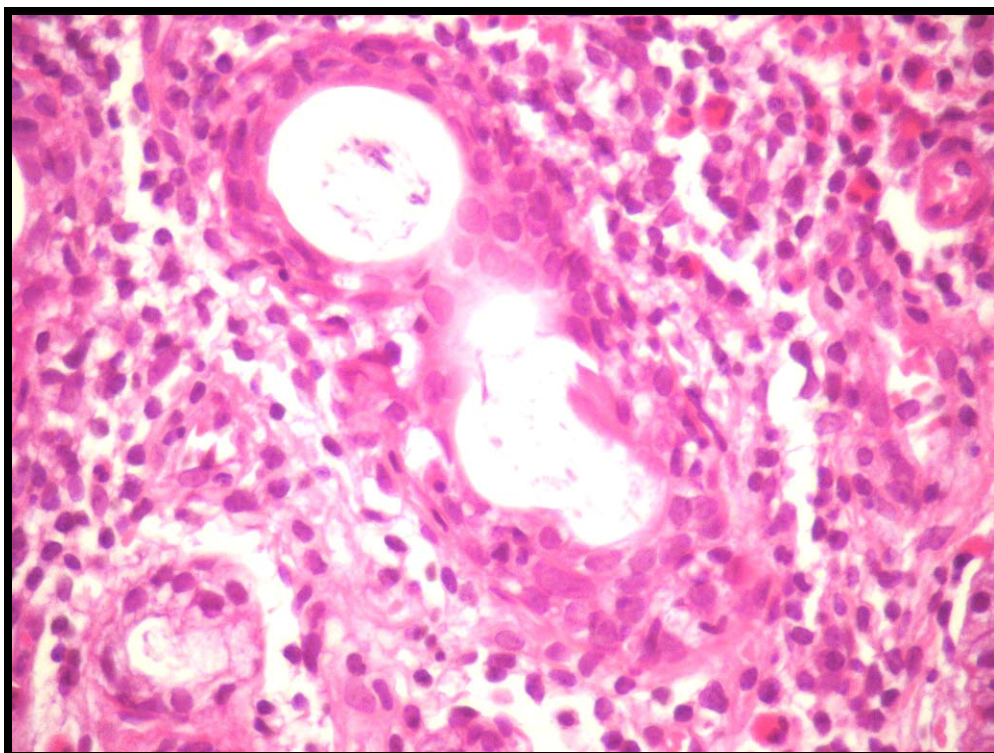


Figura 13: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 63) onde é possível observar infiltrado inflamatório crônico misto (H&E, aumento original x400).

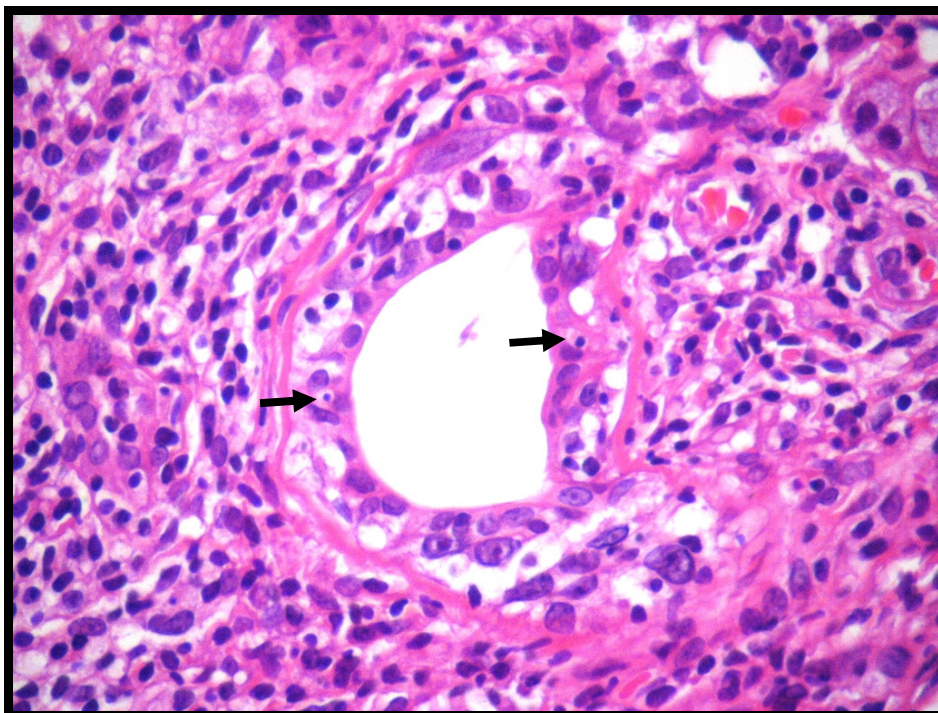


Figura 14: Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível observar células apoptóticas no epitélio ductal (H&E, aumento original x400).

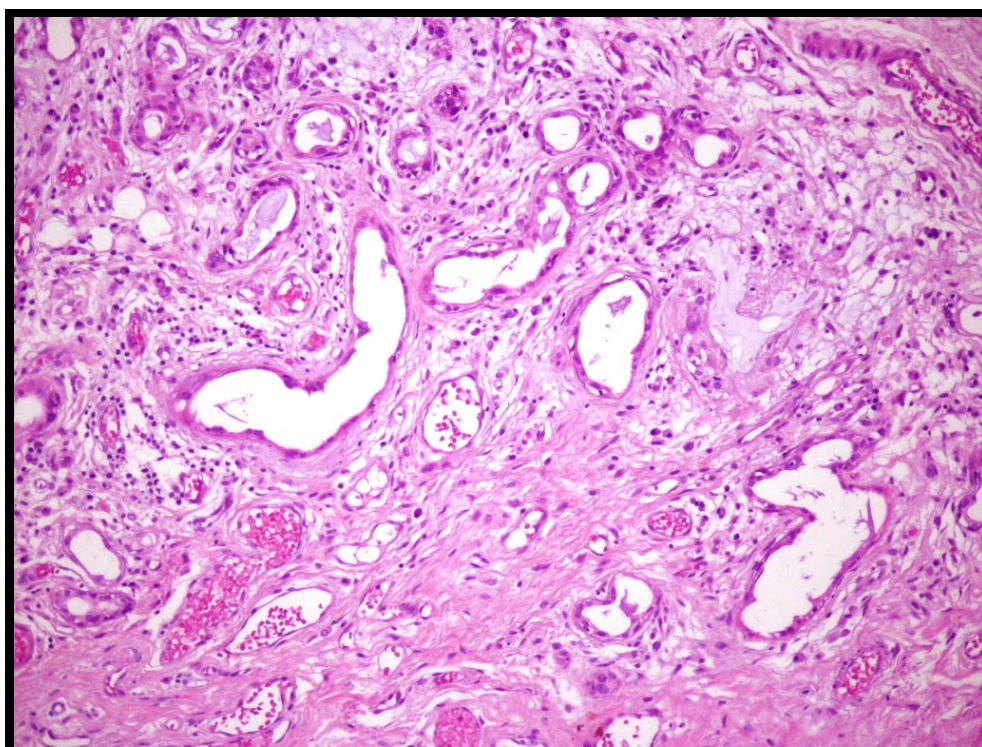


Figura 15: Corte histológico de glândula salivar menor onde é possível notar a ausência de ácinos, dilatação ductal e fibrose intersticial (H&E, aumento original x100).

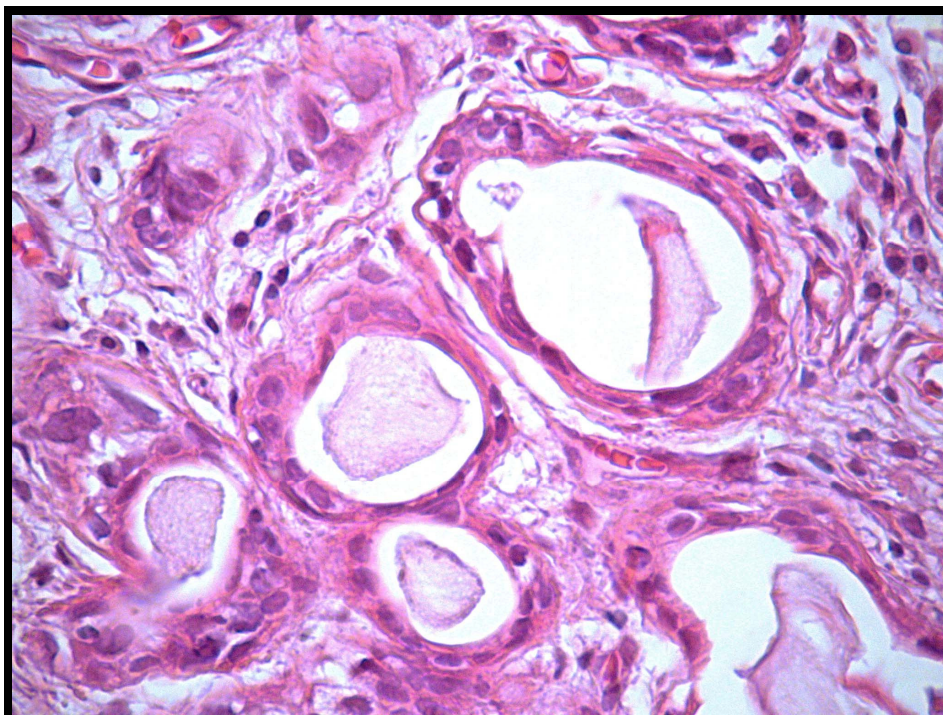


Figura 16: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 22) onde é possível observar a perda da polaridade das células ductais (H&E, aumento original x400).

Para comparação entre os resultados obtidos a partir de cada uma das classificações foi realizada a associação a seguir, grau “0” com “sem DECH”, grau “1” com “possível DECH”, grau 2, 3 e 4 com “Provável DECH” e “DECH”. Foi considerado que o grau “0” de Horn representa ausência de alterações histológicas compatíveis com DECHc, o grau “1” representa diagnóstico suspeito para DECHc e que os graus “2, 3 e 4” representam diagnóstico positivo para DECHc segundo as alterações histológicas que são descritas na classificação de Horn. Esta associação pode ser melhor entendida na Tabela 2.

Tabela 2. Associação do diagnóstico obtido a partir das classificações de Horn et al. e Shulman et al.

Graus de Horn	Classificação de Shulman
0 = DECHc negativa	————→ Sem DECHc
1 = Suspeito para DECHc	————→ Possível DECHc
2 = Compatível com DECHc	————→ Provável DECHc
3 e 4 = Positivo para DECHc	————→ DECHc

As lâminas coradas com tricrômio de Masson foram empregadas para a avaliação morfológica dos ductos. As imagens dos lóbulos glandulares de cada uma das amostras foram capturadas com uma câmara digital (Power Shot A630, Cânon) conectada ao microscópio Nikon Eclipse E200 sob as objetivas de 4x e 10x. O número de campos capturados variou com o tamanho da amostra. Assim, foram fotografados tantos campos quantos foram necessários para que todos os ductos que estavam contidos na amostra pudessem ser analisados. As imagens arquivadas foram analisadas com o auxílio de um programa de análise de imagem (Imagelab, 2000). A somatória das áreas da luz dos ductos (Figura 17) e a área lobular total (Figura 18) (convertidas em μm) foram mensuradas.

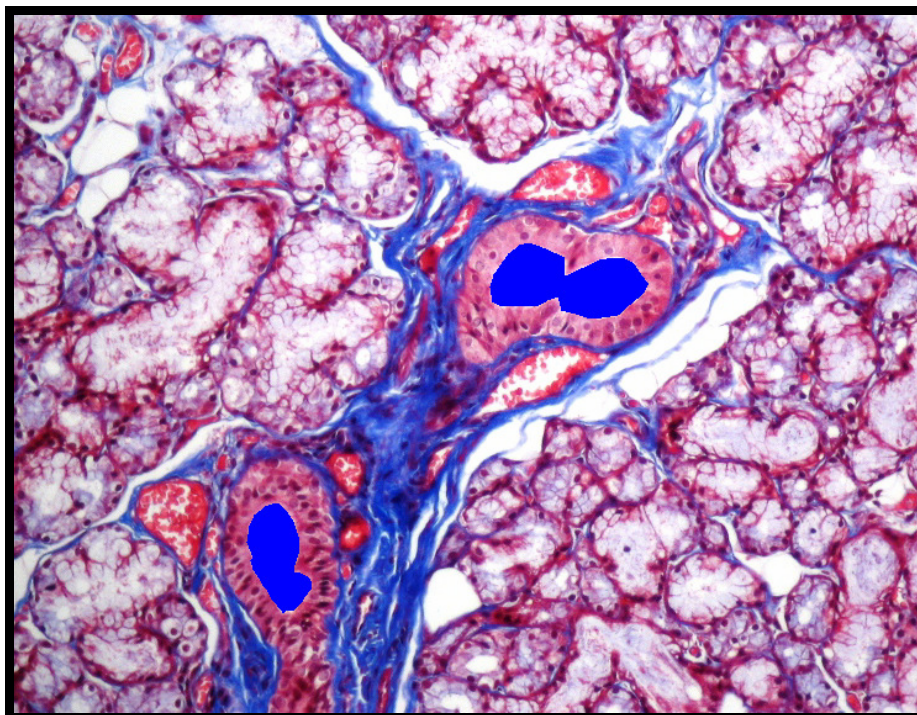


Figura 17: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 15) corada pelo Tricrômio de Masson: seleção da luz dos ductos através do uso do software Imagelab 2000. (aumento original x100).

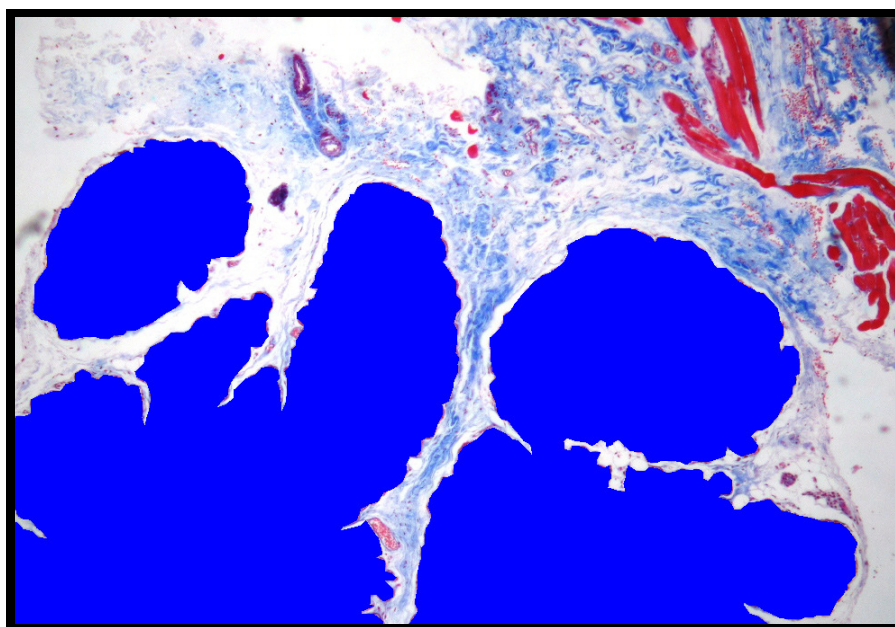


Figura 18. Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 15) corada pelo Tricrômio de Masson: seleção dos lóbulos glandulares através do uso do software Imagelab 2000. (aumento original x40).

3.2- Estudo imuno-histoquímico

Cortes histológicos (4 µm de espessura) foram obtidos a partir dos blocos de parafina contendo a amostra, desparafinados em xilol e re-hidratados. A reação imuno-histoquímica foi realizada com o método polimérico. O anticorpo primário usado foi o anti antígeno leucocitário comum (anti CD45), monoclonal (Dako Cytomation/ DAKO), diluição 1:50. O calor úmido foi usado para recuperação antigênica e o polímero EnVision (DAKO) foi usado para a reação de amplificação. Todas as reações correram em conjunto com os controles positivos e negativos apropriados. A reação foi revelada com a 3,3-diaminobenzidina-HCl (DAB) (Sigma) e contracorado com hematoxilina. As lâminas insatisfatórias para análise foram excluídas e o processo repetido.

As células marcadas com o anticorpo anti-CD45 foram quantificadas através da contagem direta em microscópio ótico com objetiva de 40x. Foi determinado o número de células imuno-marcadas na espessura do epitélio ductal. Foram avaliados todos os ductos de todos os lóbulos glandulares existentes em cada amostra. Assim, ao final da análise de cada lâmina foi obtido o número total de ductos presente na amostra, o número de ductos que apresentavam linfócitos em exocitose e o número de linfócitos em exocitose em cada um dos ductos (Figura 19).

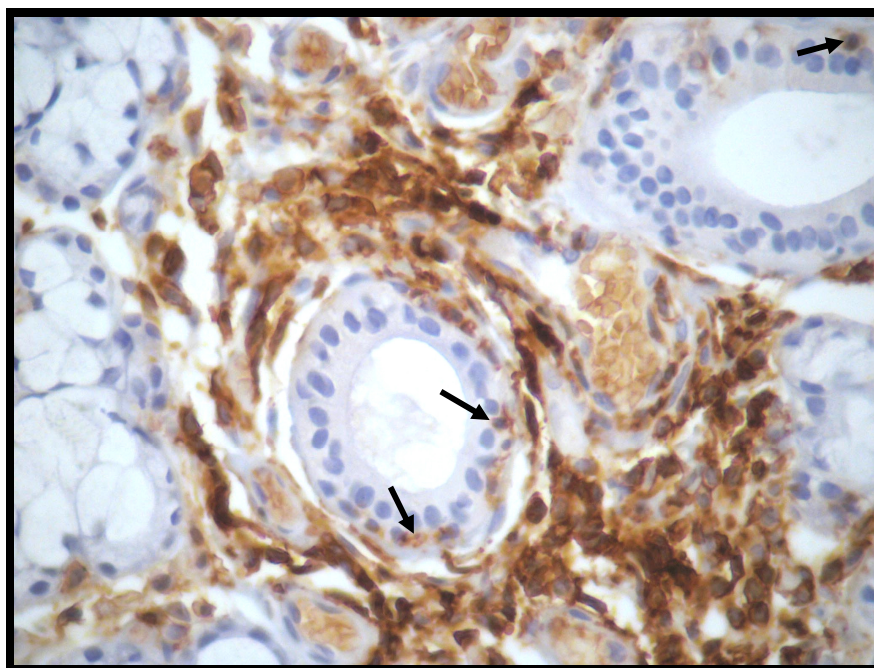


Figura 19: Corte histológico de glândula salivar menor (paciente 49) imuno-marcada pelo CD45. A seta mostra a presença de linfócitos imuno-marcados na região peri-ductal e migrando no epitélio ductal. (aumento original x400).

O estudo estatístico se iniciou com a análise descritiva. Foram identificados os fatores que seriam passíveis de comparação, no que concerne aos resultados obtidos ao diagnóstico com os critérios histológicos. Gráficos como Boxplot foram empregados para ilustrar o comportamento das variáveis contínuas nos grupos com e sem a DECH crônica.

Com a aplicação da correlação Spearman/Pearson, identificaram-se as variáveis que poderiam exercer alguma influência (positiva ou não e importante ou não) de uma sobre a outra, independente do tempo.

O teste Mann-Whitney foi aplicado para as variáveis contínuas (idade, número de linfócitos, de ductos, valor absoluto de ductos com exocitose, porcentagem de ductos com exocitose, etc), sendo avaliados dois grupos: os que desenvolveram e os que não desenvolveram a DECH crônica extensa. Para as variáveis categóricas aplicou-se o teste de Fisher ou χ^2 sendo que as variáveis mais importantes foram os critérios histológicos (degeneração acinar/fibrose intersticial / ectasia ductal, dilatação ductal) e os critérios de Horn, também considerando o evento da DECH crônica.

O método Kaplan-Meier, aliado ao teste do Log-Rank (que possibilita analisar a influência das variáveis no decorrer do tempo), foi utilizado para a análise da sobrevida global. A partir da identificação das variáveis significativas aplicou-se a análise de Cox univariada e multivariada (*stepwise forward Wald*) buscando avaliar as variáveis que se confirmariam ou não como significativas no decorrer do tempo.



4- RESULTADOS

As características clínicas de nossa amostra estão demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes da amostra.

Variáveis	N = 65
Idade, mediana (variação) *	36 (12-59)
Sexo, N (%)	
Masculino	39 (60)
Feminino	26 (40)
Doença, N (%) **	
LLA	8 (12)
LMC	37 (57)
SMD	2 (3)
LMA	11 (17)
AA	6 (9)
HPN	1 (2)
Estágio da doença, N (%)	
Precoce	45 (69)
Tardia	13 (20)
Não maligna	7 (11)
Enxerto, N (%)	
Medula óssea	37 (57)
Sangue periférico	28 (43)
Extensão da DECHc, N (%)	
Extensa	56 (86)
Localizada	9 (14)
Seguimento, mediana (variação) ***	68 (4- 120)
Situação, N (%)	
Óbito	22 (34)
Vivo	43 (66)
Causa do óbito, N (%)	
DECH crônico	9 (41)
Outras causas	10 (45)
Outras causas com DECH ativo	3 (14)

* Idade em anos.

** LLA: leucemia linfóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; SMD: síndrome mielodisplásica; LMA: leucemia mielóide aguda; AA: anemia aplástica, HPN: hemoglobinúria paroxística noturna.

*** Tempo de seguimento em meses.

4.1- Classificação de Shulman et al.:

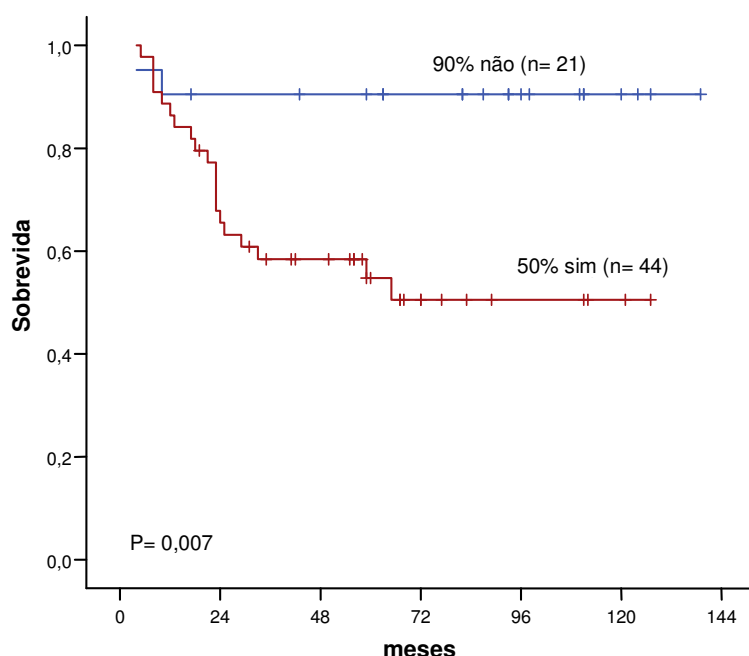
Os resultados obtidos a partir da avaliação das amostras segundo a classificação de Shulman et al podem ser observados na tabela 4 do Apêndice.

Não foi observada correlação entre o diagnóstico histopatológico (final) de Shulman et al. e a classificação clínica da DECHc. Contudo, quando os diferentes critérios histológicos que compõem esta classificação foram analisados, separadamente, sob o teste de Fisher ou chi-quadrado, o critério “degeneração acinar/ fibrose intersticial/ ectasia ductal” era diferente, significativamente, entre os pacientes que desenvolveram e os que não desenvolveram DECHc extensa ($p = 0,03$). Entretanto, quando a análise multivariada de Cox foi aplicada associando este critério com o critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” a influência não foi confirmada.

A análise dos resultados através do método Kaplan-Meier, usando o teste Log-Rank mostrou influência negativa significativa do critério histológico “linfócitos periductais com exocitose no ducto” na sobrevida global do paciente ($p = 0,007$), conforme demonstrado no Gráfico 1. A análise univariada de Cox confirmou esta influência, a saber: os pacientes que apresentaram positividade para o critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” mostraram aumento do risco relativo de ocorrer o evento óbito em 5,74 vezes ($p = 0,01$; IC95%: 1,33 – 24,6).

Este mesmo critério mostrou ter influência na ocorrência da DECHc aumentando em 1,8 vezes o risco relativo do seu desenvolvimento ($p = 0,05$; IC95%: 0,995 – 3,37) na análise univariada de Cox.

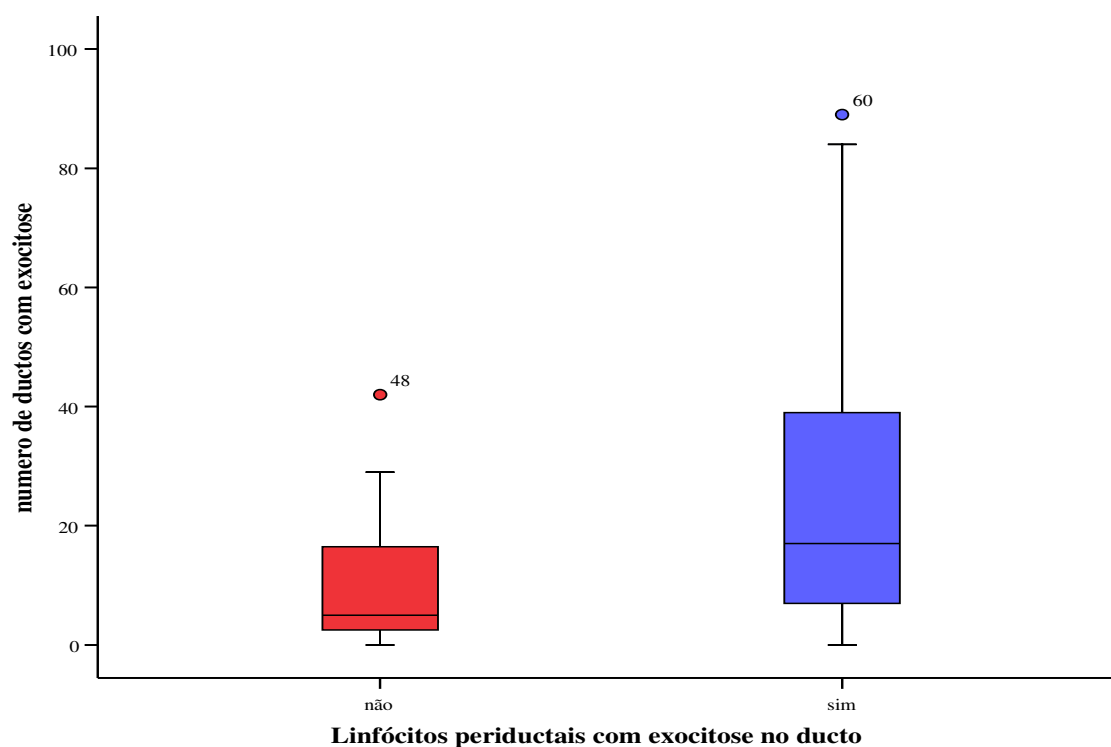
Gráfico 1. Sobrevida global em relação a positividade ou não do critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto”.



Na avaliação objetiva do critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” através da contagem direta dos ductos com exocitose, foi verificado que não há diferença significativa do número de ductos com exocitose entre os pacientes que desenvolveram e não desenvolveram DECHc extensa.

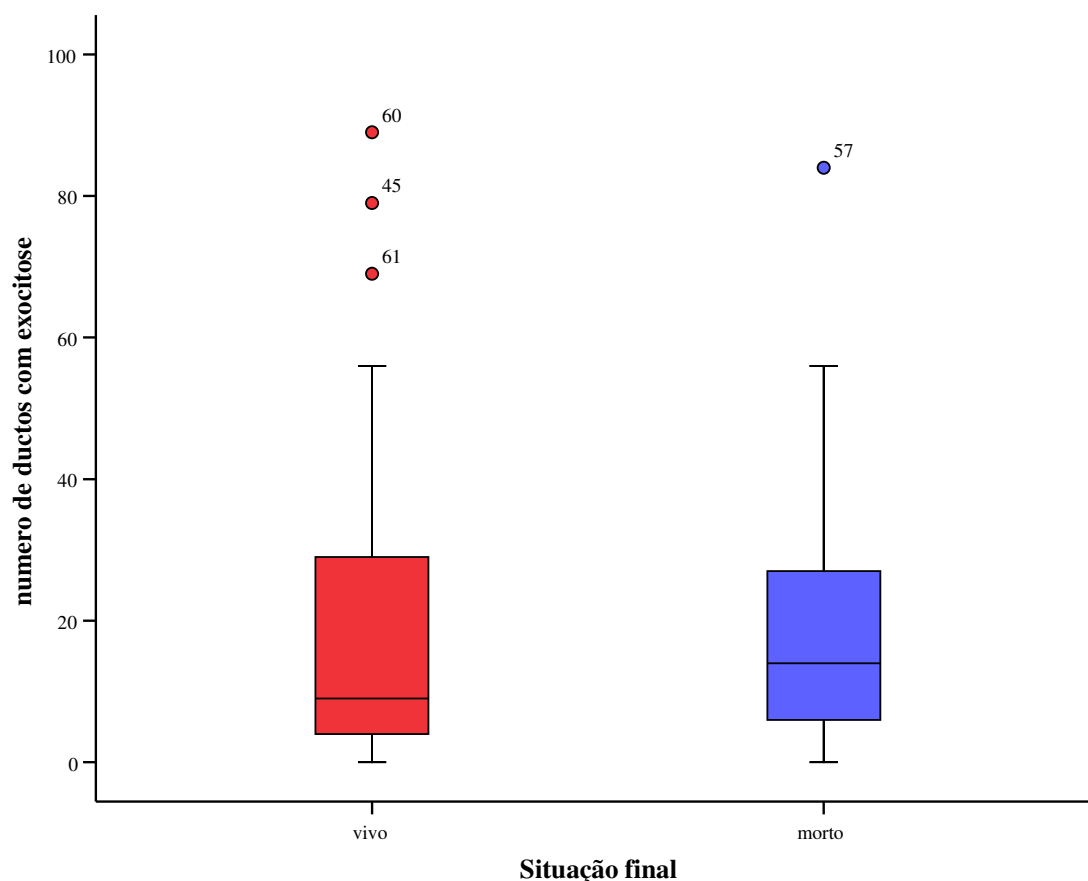
Foram comparados entre si o critério subjetivo e o resultado objetivo, e foi encontrada correlação entre eles, ou seja, o critério subjetivo “linfócitos periductais com exocitose no ducto” tem correlação com a contagem do número de ductos com exocitose ($p = 0,004$) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Relação entre o número de ductos com exocitose (contagem objetiva) e o critério subjetivo (presente ou não) “linfócitos periductais com exocitose nos ductos”.



Não foi observada diferença significativa entre o número de ductos com exocitose e a sobrevida global. Contudo, analisando a distribuição do número de ductos com exocitose em relação à situação final (vivo ou morto) dos pacientes (Gráfico 3), foi observado que aqueles que permaneceram vivos apresentaram menor número de ductos com exocitose e que, os pacientes que foram a óbito, apresentaram maior número de ductos com exocitose. No gráfico podemos verificar também a presença de *outliers*, ou seja, pontos extremos que estão fora do intervalo de confiança e que provavelmente interferiram na significância deste critério. Assim, é provável que, se for analisado um número maior de pacientes, a diferença estatística mostre-se significativa.

Gráfico 3. Relação entre a situação final dos pacientes com DECHc e o número de ductos com exocitose de linfócitos.



Quando consideramos a área dos ductos (AD) em relação à área lobular total (ALT) e correlacionamos com a % de ductos com exocitose (%DE) através da operação $AD \times \%DE / ALT$ verificamos que independente do tamanho da amostra analisada, a porcentagem de ductos acometidos tem variação desprezível, ou seja, o volume da amostra não altera os resultados.

4.2- Classificação de Horn et al.:

Após a avaliação das amostras, segundo a classificação de Horn et al, cada um dos casos foi graduado (resultados podem ser observados na Tabela 5 do Apêndice).

Quanto à classificação de Horn, foi observada correlação entre o critério “infiltrado linfocítico periductal” e a extensão da DECHc ($p = 0,04$).

Não foi observada correlação entre o critério “dilatação ductal” e a extensão da DECHc (correlação de Pearson).

Por fim, foi encontrada correlação significativa entre os graus histológicos obtidos através da classificação de Horn e os diagnósticos histopatológicos finais da classificação de Shulman et al. ($r = 87\%$, $p = 0,0001$). A distribuição dos diagnósticos auferidos nas amostras avaliadas, segundo cada uma das classificações é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição do diagnóstico obtido através das classificações de Horn e Shulman.

Classificação	HORN		SHULMAN	
	N	%	N	%
Negativo	9	13,8	8	12,3
Grau 1/ Suspeito	16	24,6	16	24,6
Grau 2/ Provável	12	18,5	6	9,2
Grau 3 e 4/ Positivo	28	43,1	35	53,8



5- DISCUSSÃO

O diagnóstico preciso da DECH é essencial para a condução apropriada do tratamento, que requer o conhecimento de critérios mínimos clínico-patológicos. Para o estabelecimento de um sistema de classificação histológica funcional, cada grau ou categoria de diagnóstico deve se correlacionar com parâmetros clínicos.

O exame histopatológico das GSMs é importante na abordagem do paciente com DECHc oral. Nakamura et al.(1996) observaram que as alterações histológicas da GSM e mucosa oral são as mais fidedignas para refletir o *status* da DECHc; suas alterações podem ter valor preditivo no reconhecimento precoce da manifestação de DECHc em outros órgãos. Correa et al. (1999) demonstraram que o acometimento das GSM e mucosa oral pela DECHc pode estar associado a sobrevida menor dos pacientes.

Alguns critérios histológicos foram relatados como significantes para o diagnóstico da DECHc oral, tais como o infiltrado linfocítico, danos ao epitélio ductal e aos ácinos e presença de fibrose (Sale GE 1981, Nakhleh RE 1989, Hiroki et al, 1994). Baseados nestes trabalhos, Horn et al. (1995) e Shulman et al (2006) propuseram dois sistemas de classificação que, além de contemplar os principais achados histológicos para o diagnóstico da DECHc, também buscavam determinar a gravidade dos danos causados às GSMs (Horn) .

Quando aplicada a classificação de Horn et al., foi demonstrado que a GSM revela com maior frequência a agressão linfocitária da DECHc que a mucosa bucal, a gravidade crescente dos seus graus pode estar associada a menor sobrevida (Correa, 1999) e estes graus mostram correlação com o diagnóstico da DECHc (Alborguetti et al, 2005). Todos os pacientes com DECHc apresentam alterações histológicas das glândulas salivares labiais (Alborguetti et al. 2005, Soares et al. 2005).

A análise das categorias diagnósticas de Shulman et al. nos nossos pacientes com DECHc, nenhuma correlação clínica ou prognóstica pôde ser demonstrada. Mas o estudo de cada critério, separadamente, revelou alguns resultados significantes.

Um importante achado foi o infiltrado inflamatório linfocitário peri-ductal.

Na classificação de Shulman foi encontrada correlação estatística entre o critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” e a sobrevida; através do teste Log-Rank, método de Kaplan-Meier (Gráfico 1) foi encontrada significativa influência deste critério na sobrevida ($p = 0,007$), a qual foi confirmada pela análise univariada de Cox, com risco relativo de 5,74 ($p = 0,01$). Embora o intervalo de confiança seja grande, é possível inferir que a presença de linfócitos periductais com exocitose nos ductos conduz a um aumento no risco de óbito.

Na classificação de Horn, o critério “infiltrado linfocítico periductal” mostrou correlação com a forma clínica localizada ou extensa da DECHc ($p = 0,004$). Este resultado alinha-se ao relatado por Nakamura et al. (1996) que observaram correlação entre a intensidade dos achados histológicos em outros órgãos e a presença de infiltrado linfocítico periductal nas GSMs.

Alguns achados histológicos, a saber, degeneração acinar, fibrose intersticial e dilatação ductal estão presentes em ambas as classificações. Shulman et al apresenta estes achados num único parâmetro (“degeneração acinar/ fibrose intersticial/ ectasia ductal”), enquanto que, na classificação de Horn, estes achados são avaliados individualmente. Empregando a classificação de Shulman, foi encontrada diferença estatística comparando pacientes que desenvolveram DECHc extensa com aqueles que não a desenvolveram. Aplicando o teste multivariado de Cox, esta influência não foi confirmada, talvez pelo número insuficiente de casos ou de tempo de seguimento.

Dilatação ductal na classificação de Horn et al, não mostrou correlação com a forma clínica da DECHc (correlação de Pearson). Este achado tem sido considerado como um dos critérios para diagnóstico histológico da DECHc (Nakamura 1996, GE Sale 1981, Horn 1995, Nakhleh RE 1989). Entretanto esta alteração pode ser apenas consequência da atrofia decorrente do regime de condicionamento, enquanto que o critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” está provavelmente, relacionado não apenas ao diagnóstico da DECHc em GSM, mas também à gravidade sistêmica da doença. Soares et al. (2005) apresentaram resultados que suportam nossa suposição; em seu trabalho, não foi encontrada diferença significativa quanto à presença de dilatação ductal, comparando-se pacientes que não desenvolveram DECHc com aqueles que desenvolveram.

Alborgueti et al (2005) relataram que variáveis graus de fibrose são observados em pacientes que não desenvolveram DECHc, sugerindo que esta alteração não é um achado exclusivo da doença. Destruição acinar e fibrose intersticial, observadas através da classificação de Horn, não mostraram correlação com o prognóstico nem com as manifestações clínicas destes pacientes. Talvez, estes achados sejam compartilhados com outras condições que não a DECHc mas, quando avaliados em conjunto com a dilatação ductal como proposto na classificação de Shulman, reflitam a parcela de contribuição ao diagnóstico de DECHc.

A observação de que há correlação entre a contagem objetiva de ductos com linfócitos em exocitose e a positividade para o critério subjetivo “linfócitos periductais com exocitose nos ductos” ($p = 0,004$) permite inferir que a observação subjetiva deste achado, conforme proposta por Shulman, pode ser considerada confiável. Ademais, a comparação entre o número de ductos com exocitose em pacientes que desenvolveram DECHc extensa e aqueles que não desenvolveram, não mostrou significância estatística. Tais resultados sugerem que este achado deve ter importância clínica qualitativa e não quantitativa.

À análise digital da área relativa dos ductos, foi encontrado que, independentemente do tamanho da amostra de GSM biopsiada, a porcentagem de ductos com linfócitos em exocitose apresentou variação mínima. Uma das limitações ao diagnóstico da DECHc pelo exame histopatológico apresentadas por Shulman et al. (2006), é, justamente, a variação do tamanho das amostras nas biópsias orais, que poderia interferir no diagnóstico diferencial entre a DECHc em atividade e as alterações pré-existentes. Assim, segundo os nossos resultados, podemos sugerir que a ampla variação no volume das amostras obtidas não influencia os resultados, permitindo abordagem menos invasiva à obtenção das biópsias labiais nestes pacientes já debilitados pelas co-morbidades e imunossupressão.

Foi encontrada correlação alta entre os graus de Horn e os diagnósticos finais de Shulman ($R = 87\%$, $p = 0,0001$). O que é, de certa forma esperado, afinal ambas as classificações incluem os achados mais importantes para o diagnóstico da DECHc em GSM. No entanto, existem substanciais diferenças entre elas. A classificação de Horn et al. visa caracterizar o diagnóstico de DECHc em si (grau 1 apenas suspeito para DECHc e

graus 2 a 4 com elementos que permitem o diagnóstico da doença). Adicionalmente, estratifica o conjunto dos achados de acordo com a intensidade de acometimento da glândula, o que pode acrescentar elementos que interferem com a reprodutibilidade do método. No entanto, Alborguetti et al. (2005) verificaram íntima relação dos graus de Horn com o diagnóstico de DECHc. No nosso trabalho, a capacidade diagnóstica das duas classificações não foi testada, uma vez que só foram estudadas as glândulas de pacientes com sinais clínicos bem característicos de DECHc oral (xerostomia e suas complicações).

Para aplicar a classificação de Shulman et al., os diferentes critérios devem ser avaliados como presentes ou ausentes o que, provavelmente, reduz a variação de resultados obtidos por diferentes observadores. Contudo, não são fornecidas instruções precisas a respeito de quais e quantos dos critérios avaliados devem estar presentes para as categorias de diagnóstico (“Sem DECH”, “Possível DECH”, “Provável DECH” e “DECH”). Embora não tenha sido encontrada correlação estatística entre a classificação final de Shulman et al. e o prognóstico do paciente, deve-se considerar que alguns dos parâmetros que compõem a classificação mostraram importância significativa. É possível que, à medida que os critérios mais significantes para o diagnóstico sejam validados por trabalhos, mais precisa passe a ser a distribuição das quatro categorias de diagnóstico e, então, seja encontrada relação com o prognóstico.



6- CONCLUSÕES

1. Foi observada correlação positiva entre os graus obtidos pela classificação de Horn e os diagnósticos finais de Shulman.
2. Não foi encontrada correlação entre o diagnóstico obtido através da classificação de Shulman et al. e a sobrevida ou a forma clínica da DECHc; da mesma forma não houve correlação entre os graus de Horn et al. e a sobrevida ou forma clínica da DECHc.
3. Quanto à significância prognóstica dos critérios histológicos empregados nas classificações de Horn e Shulman, observou-se que:
 - A presença do critério “linfócitos periductais com exocitose no ducto” se correlacionou com a queda da sobrevida global do paciente.
 - A presença do achado “degeneração acinar/ fibrose intersticial/ dilatação ductal” mostrou influência no desenvolvimento da forma extensa da DECHc.
 - A presença do critério “infiltrado linfocítico periductal” se correlacionou com o desenvolvimento da forma extensa da DECHc.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 398.
2. AkpeK G, Zahurak ML, Piantadosi S, Margolis J, Doherty J, Davidson R, Vogelsang GB. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001; 97:1219-26.
3. Alborghetti MR, Correa MEP, Adam RL, Coracin FL, Souza CA, Cintra ML. Late effects of chronic graft-vs.-host disease in minor salivary glands. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 486-93.
4. Anasetti C. Advances in the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77: S79-83.
5. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol* 2006; 13:426-35.
6. Belkacemi Y, Rio B, Touboul E. Irradiation corporelle totale: techniques, dosimetrie et complications. *Cancer Radiother* 1999; 3: 162-73.
7. Bensinger WI, Mertin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344: 175-81.
8. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reaction. *Harvey Lect* 1966- 67; 62: 21-78.
9. Chiodi S, Spinelli S, Ravera G, Petti AR, Van Lint MT, Lamparelli T, et al. Quality of life in 244 recipients of allogeneic bone marrow transplantation. *British J Haemathol* 2000; 110: 614-9.
10. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation-how, when and for whom? *Blood Rev* 2004; 18: 167-79.

11. Correa MEP. A mucosa oral e glândulas salivares acessórias na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica pós transplante de medula óssea: estudo prospectivo dos primeiros 63 transplantes de medula óssea; Análise comparativa com parâmetros clínicos e biópsias de pele [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1999.
12. Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolaños-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J, et al. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 375-96.
13. Demarosi F, Bez C, Carrassi A. Prevention and treatment of chemo- and radiotherapy-induced oral mucositis. *Minerva Stomatol* 2002; 51: 173-86.
14. Ferrara JLM, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cell* 1996; 14: 473-89.
15. Ferrara JLM, Reddy P. Pathophysiology of Graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006; 43: 3-10.
16. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11:945-55.
17. Flowers MED, Parker PM, Johnston LJ, Matos AVB, Storer B, Bensinger WI, et al. Comparison of chronic graft-versus-host-disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; 100: 415-9.
18. Fraser CJ, Baker KS. The management and outcome of chronic graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*. 2007; 138:131-45.

19. Fraser CJ, Bhatia S, Ness K, Carter A, Francisco L, Arora M, et al. Impact of chronic graft-versus-host-disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 2006; 108: 2867-73.
20. Greinix, HT, Pohlreich D, Maalouf J, Soukup P, Supper V, Kalbs P, Knobler RM. A single-center pilot validation study of a new chronic GVHD scoring system. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13:715-23.
21. Hess AD, Thoburn CJ. Immunobiology and immunotherapeutic implications of syngeneic/autologous graft-vs-host disease. *Immunol Rev* 1997; 157: 111-23.
22. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90:3204-13.
23. Hiroki A, Nakamura S, Shinohara M, Oka M. Significance of oral examination in chronic graft-versus-host disease. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 209-15.
24. Hood AF, Volgelsang GB, Black LP, Farmer ER, Santos GW. Acute graft-versus-host disease: development following autologous and syngeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1987; 123:745-51.
25. Horn TD, Rest EB, Mirenski Y, Corio RL, Zahurak ML, Marianna L, et al. The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1995; 131: 964-5.
26. Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Rev* 2006; 20: 15-17.
27. Imanguli MM, Pavletic SZ, Guadagnini JP, Brahimi JS, Atkinson JC. Chronic graft versus host disease of oral mucosa: review of available therapies. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:177-85.

28. Jacobson DA, Montross S, Anders V, Volgelsang GB. Clinical importance of confirming or excluding the diagnoses of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:1047-51.
29. Jankowski RA, Ildstad ST. Chimerism and tolerance: from freemartin cattle and neonatal mice to humans. *Hum Immunol* 1997; 52: 155-61.
30. Kiss TL, Abdoell M, Jamal N, Minden MD, Lipton JH, Messner HA. Long-term mediocal outcomes and quality-of-life assessment of patients with chronic myeloid leukemia followed at least 10 years after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2334-43.
31. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med* 1990; 322: 510-7.
32. Lamey PJ, Lundy FT, Al-Hashimi I. Sjögren's syndrome: a condition with features of chronic graft-versus-host disease: does duct cell adhesion or permeability play a role in pathogenesis? *Med Hypotheses* 2004; 62:825-9.
33. Lee SJ, Klein JP, Barret AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002; 100:406-14.
34. Martin PJ, Weisdorf D, Przepiorka D, Hirschfeld S, Farrell A, Rizzo JD, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 491-505.
35. Mohty M, Faucher C, Vey N, Stoppa AM, Viret F, Chabbert I, Chabannon C, Bouabdallah R, Ladaïque P, Collet L, Zandotti C, Maraninchi D, Blaise D. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 251-5.
36. Nagler RM, Nagler A. The molecular basis of salivary gland involvement in graft-vs.-host disease. *J Dent Res* 2004; 83: 98-103.

37. Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M, Gondo H, Ohyama Y, Mouri T, et al. Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:556-63.
38. Nakhleh RE, Miller W, Snover DC. Significance of mucosal vs. salivary gland changes in lip biopsies in the diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113:932-4.
39. Nicolau-Galitis O, Kitra V, Vliet-Constantinidou CV, Peristeri J, Goussetis E, Petropoulos D, Grafakos S. The oral manifestations of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in paediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Oral Pathol Med* 2001; 30:148-53.
40. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, Cowen EW, et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 252-66.
41. Quaranta S, Shulman H, Ahmed A, Shoenfeld Y, Peter J, McDonald GV, et al. Autoantibodies in human chronic graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol* 1999; 91:106-16.
42. Remberger M, Kumlier G, Aschan J, Barkholt L, Hentschke P, Ljungman P, et al. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:674-82.
43. Sale GE, Shulman HM, Shubert MM, Sullivan KM, Kopecky KJ, Hackman RC, et al. Oral and ophthalmic pathology of graft-versus-host disease in man: predictive value of the lip biopsy. *Hum Pathol* 1981; 12: 1022-30.
44. Santos GW, Cole JL. Effects of donor and host lymphoid and myeloid tissue injections in lethally x-irradiated mice treated with rat bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1958; 2: 279.

45. Schaffer JV. The changing face of graft-versus-host disease. *Semin Cutan Med Surg* 2006; 25: 190-200.
46. Schubert MM, Sullivan KM. Recognition, incidence, and management of oral graft-versus-host disease. *NCI Monogr.* 1990; 9:135-43.
47. Schubert MM, Sullivan KM, Morton TH, Izutsu KT, Peterson DE, Flournoy N, et al. Oral manifestations of chronic graft-v-host disease. *Arch Intern Med* 1984; 144: 1591-5.
48. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, et al. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:126-37.
49. Shimoni A, Nagler A. Nonmyeloablative stem cell transplantation: lessons from the first decade of clinical experience. *Curr Hematol Rep* 2004; 3: 242-8.
50. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E, et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:31-47.
51. Shulman HM, Sale GE, Lerner KG, Barker EA, Weiden PL, Sullivan K, et al. Chronic cutaneous graft-versus-host disease in man. *Am J Pathol* 1978; 91: 545-70.
52. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald MD, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host disease in Man. A Long-term clinicopathologic study of 20 Seattle Patients. *Am J Med* 1980; 69: 204-17.
53. Shulman, H.M., Sale, G.E. Pathology of acute and chronic cutaneous GVHD. In: Sale GE, Shulman HM. *The pathology of bone marrow transplantation*. Chicago: Masson Publishing; 1984. p 40-76.

54. Sloane JP, Powles RL, Olsson L, Kiger N, Mathé G, Gluckman E, et al. Graft-versus-host disease in recipients of syngeneic bone marrow. *Lancet* 1980;315:253-4.
55. Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa MEP, Sousa CA, Almeida OP, Cintra ML. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathology and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:368-73.
56. Storek J, Gooley T, Siadak M, Bensinger WI, Maloney DG, Chauncey TR, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1997; 90:4705-09.
57. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991; 28:250-9.
58. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, McDonald RP, Witherspoon RP, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 1981; 57:267-76.
59. Sullivan KM, Shulman HM, Weiden PL, et al. The spectrum of chronic graft-vs-host disease in man. In: *Biology of Bone Marrow Transplantation*. Gale RP, Fox. New York: Academic Press; 1980. p.69-73.
60. Teshima T, Wynn TA, Soiffer RJ, Matsuoka KI, Martin PJ. Chronic graft-versus-host disease: how can we release Prometheus? *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:142-50.
61. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96:2703-11.
62. Treister NS, Cook EFJ, Antim J, Lee SJ, Soiffer R, Woo SB. Clinical evaluation of oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 110-115.

63. Treister NS, Woo SB, O'Holleran EW, Lehmann LE, Parsons SK, Guinan EC. Oral chronic graft-versus-host disease in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol blood Marrow Transplan* 2005; 11:721-31.
64. Vogelsang GB. How I treat graf-versus-host disease. *Blood* 2001; 97: 1196-201.
65. Vogelsang GB, Wagner JE. Graft-versus-Host Disease. *Bone Marrow Transplant* 1990; 4: 625-39.
66. Weiden P, Sale GE, Shulman HM. Human marrow transplantation: an overview. In: Sale GE, Shulman HM. *The pathology of bone marrow transplantation*. Chicago: Masson Publishing; 1984. p.1-10.
67. Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-vs-host Disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 201-16.



8- APÊNDICES

8.1- Tabela 1. Características clínicas.

n° Paciente	DBx	Sexo	Idade	Doença*	Enxerto	DECHc	Tempo de seguimento**	Situação final	Causa do óbito
1	215	F	14	LLA	MO	Ext	23	óbito	DECHc
2	1074	M	19	LLA	MO	Ext	167	vivo	
3	642	M	46	LMC	MO	Ext	29	óbito	DECHc
4	1447	M	48	SMD	SP	Ext	147	vivo	
5	690	F	41	LMC	SP	Ext	153	vivo	
6	103	M	23	LMA	MO	Ext	9	óbito	Outras + DECHc
7	125	M	48	LMC	SP	Loc	66	óbito	Outras
8	111	M	16	LMC	SP	Ext	24	óbito	Outras + DECHc
9	294	M	37	LLA	MO	Loc	134	vivo	
10	1666	M	36	LMC	MO	Ext	144	vivo	
11	112	M	38	SMD	MO	Ext	9	óbito	DECHc
12	733	F	43	LMC	SP	Ext	138	vivo	
13	320	M	17	LMC	MO	Ext	128	vivo	
14	78	F	21	AA	MO	Loc	137	vivo	
15	223	M	21	AA	MO	Ext	134	vivo	
16	60	M	42	LMC	MO	Ext	4	óbito	DECHc
17	521	M	29	LMC	SP	Ext	124	vivo	
18	300	F	21	LMC	SP	Ext	126	vivo	
19	140	F	29	LMC	SP	Ext	120	vivo	
20	123	F	43	LMC	SP	Ext	4	óbito	DECHc
21	146	M	27	HPN	SP	Ext	117	vivo	
22	217	M	44	LMC	MO	Ext	24	óbito	Outras
23	1681	F	42	LMC	SP	Ext	110	vivo	
24	588	F	43	LMC	SP	Ext	106	vivo	
25	140	F	12	LMC	MO	Ext	112	vivo	
26	106	F	25	LMC	SP	Ext	103	vivo	
27	120	M	24	LMC	MO	Ext	101	vivo	
28	392	M	59	LMC	MO	Ext	96	vivo	
29	109	M	31	LLA	SP	Ext	9	óbito	Outras + DECHc
30	446	M	22	LMC	MO	Ext	102	vivo	
31	285	M	34	LMC	MO	Ext	12	óbito	Outras
32	202	M	41	LMC	SP	Loc	98	vivo	
33	103	F	24	LMC	MO	Ext	99	vivo	
34	124	M	37	LMC	MO	Loc	93	vivo	
35	721	M	32	LMC	SP	Ext	51	óbito	DECHc
36	124	F	30	LMC	SP	Ext	85	vivo	
37	517	M	20	LMA	MO	Ext	34	óbito	Outras + DECHc
38	1093	M	26	AA	MO	Ext	80	vivo	
39	225	F	25	AA	MO	Ext	18	óbito	Outras
40	263	F	45	AA	MO	Ext	28	óbito	DECHc
41	162	F	15	LLA	SP	Ext	8	óbito	DECHc
42	77	M	41	LMC	MO	Ext	78	vivo	

Continuação da Tabela 1. Características clínicas.

n° Paciente	DBx	Sexo	Idade	Doença*	Enxerto	DECHc	Tempo de seguimento**	Situação final	Causa do óbito
43	161	M	40	LMA	SP	Ext	15	óbito	Outras
44	200	M	36	LMC	MO	Ext	73	vivo	
45	308	M	43	LMA	SP	Ext	75	vivo	
46	123	F	47	LMA	MO	Ext	69	vivo	
47	359	M	14	LMA	SP	Ext	72	vivo	
48	148	F	26	AA	MO	Loc	68	vivo	
49	223	M	36	LMA	MO	Ext	73	vivo	
50	96	F	45	LMC	MO	Loc	71	vivo	
51	826	M	19	LLA	SP	Ext	64	vivo	
52	230	F	42	LMC	MO	Ext	61	vivo	
53	708	M	43	LMC	MO	Ext	63	vivo	
54	537	M	37	LLA	SP	Ext	60	vivo	
55	82	M	47	LMC	MO	Ext	23	óbito	DECHc
56	221	M	31	LMC	MO	Loc	59	vivo	
57	602	F	54	LMC	SP	Ext	23	óbito	Outras
58	439	F	39	LMA	SP	Ext	32	vivo	
59	130	M	32	LMA	SP	Ext	53	vivo	
60	147	F	52	LMC	SP	Ext	50	vivo	
61	193	M	43	LMA	MO	Loc	40	vivo	
62	110	F	48	LMC	MO	Ext	13	óbito	Outras + DECHc
63	247	M	31	LLA	SP	Ext	9	óbito	Outras
64	292	F	28	LMA	SP	Ext	21	óbito	
65	90	F	44	LMC	MO	Ext	30	vivo	

DBx: dia (pós TMO) da coleta da biópsia; Enxerto: tipo de enxerto, SP: sangue periférico, MO: medula óssea; DECHc: classificação clínica da DECHc, Loc: localizada, Ext: Extensa; *LLA: leucemia linfóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; SMD: síndrome mielodisplásica; LMA: leucemia mielóide aguda; AA: anemia aplástica, HPN: hemoglobinúria paroxística noturna. **Tempo de seguimento em meses.

8.2- Tabela 4: Avaliação das amostras segundo a classificação de Shulman et al.

nº Paciente	Exo duc	Inf c peri	Exo ac	Apopt	Fib peri	Des ac/ fib/ ect duc	Met onc	Polar	Diag final
1	1	1	1	0	1	1	0	1	3
2	1	1	0	0	1	1	0	1	3
3	1	1	0	1	1	1	1	1	3
4	1	1	1	1	1	1	0	1	3
5	0	0	1	0	0	1	1	1	1
6	1	1	1	1	0	0	0	1	3
7	1	1	1	1	1	1	0	1	3
8	1	1	0	1	0	1	0	1	3
9	1	1	1	1	1	1	0	1	3
10	1	1	1	0	1	1	0	1	1
11	0	0	0	0	0	1	0	1	1
12	0	1	0	0	1	1	0	1	1
13	0	0	1	0	0	0	0	1	1
14	0	1	0	0	0	0	0	1	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	1	0	0	1	0
17	0	1	0	0	0	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	3
19	0	0	0	0	0	0	0	1	0
20	1	1	1	0	1	1	0	1	3
21	1	0	1	0	0	0	0	0	0
22	1	1	1	0	1	1	0	1	3
23	0	1	0	1	1	1	1	1	3
24	0	0	1	0	1	1	0	1	3
25	0	1	1	0	0	0	0	0	2
26	0	0	1	0	0	0	0	1	1
27	0	0	1	0	0	0	1	0	0
28	1	1	1	0	1	1	1	1	3
29	1	1	0	0	1	0	1	0	0
30	0	1	1	0	0	1	1	1	1
31	1	1	1	1	0	1	0	1	2
32	0	1	1	0	1	1	0	1	3
33	1	1	1	0	0	1	1	1	3
34	1	1	1	0	0	0	0	0	1
35	1	1	0	0	1	1	0	1	3
36	1	1	1	0	0	1	1	1	1
37	1	1	1	0	1	1	0	1	3
38	1	1	1	0	0	0	0	0	2
39	1	1	1	0	0	1	0	0	0
40	1	1	0	0	1	1	1	1	1
41	1	1	1	0	0	1	0	0	1

Continuação da Tabela 4. Avaliação das amostras segundo a classificação de Shulman et al.

n° Paciente	Exo duc	Inf c peri	Exo ac	Apopt	Fib peri	Des ac/ fib/ ect duc	Met onc	Polar	Diag final
42	0	1	1	0	1	1	1	1	1
43	1	1	1	0	1	1	0	1	3
44	1	1	1	1	1	1	1	1	3
45	1	1	1	1	1	1	0	1	3
46	1	1	1	1	1	1	0	1	3
47	1	1	1	1	1	1	0	1	3
48	0	1	1	0	0	1	0	0	1
49	1	1	1	0	1	1	0	1	3
50	0	1	0	0	0	0	0	1	1
51	1	1	0	1	1	0	0	0	2
52	1	1	1	1	1	1	0	1	3
53	1	1	1	1	1	1	1	1	3
54	1	1	1	1	1	1	0	1	3
55	1	1	1	1	1	1	0	1	3
56	1	1	1	0	1	1	0	1	3
57	1	1	1	1	1	1	1	1	3
58	1	1	1	1	1	1	0	1	3
59	0	1	0	0	0	0	1	0	1
60	1	1	1	1	1	1	0	1	3
61	1	1	1	1	1	1	0	1	3
62	1	1	1	1	1	1	0	1	3
63	1	1	1	1	1	1	0	1	3
64	1	1	1	1	1	1	1	1	2
65	0	1	1	1	1	1	0	1	2

Exo duc: Linfócitos periductais em exocitose no ducto, Inf c peri: Infiltrado crônico misto periductal, Exo ac: Linfócitos ao redor e migrando para os ácinos, Apopt: Células apoptóticas em ductos/ácinos, Fib peri: Fibrose periductal, Des ac/ fib/ ect duc: Degeneração acinar/ fibrose intersticial/ ectasia ductal, Met onc: Metaplasia oncocítica (em crianças), Polar: Perda da polaridade das células do epitélio ductal; 0: ausente, 1: presente; Diag final: Diagnóstico final, 0: negativo, 1: possível DECHc, 2: consistente com DECHc, 3: positivo para DECHc.

8.3- Tabela 5: Avaliação das amostras segundo a classificação de Horn et al.

n° Paciente	Inf int	Inf peri	Des ac	Dil duc	Fib	Met esc	Des duc	P cel duc	Ac muc	Grau
1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2
2	2	0	3	1	2	0	1	0	1	4
3	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2
4	1	1	3	2	2	0	0	0	1	4
5	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
6	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2
7	1	1	2	1	1	0	0	1	1	3
8	1	1	1	1	1	0	0	0	1	2
9	2	1	2	1	2	0	0	1	1	3
10	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
11	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
12	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
13	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
14	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
17	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
18	1	1	1	1	1	0	0	0	1	2
19	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
20	2	1	2	2	2	0	0	1	1	4
21	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
22	2	0	2	2	2	1	0	1	1	4
23	1	1	1	1	1	0	0	0	1	2
24	1	0	2	2	2	0	0	1	1	4
25	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2
26	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
27	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
28	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
29	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
31	1	1	1	1	1	0	0	0	1	2
32	2	1	2	1	1	0	0	0	1	3
33	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2
34	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
35	1	1	3	2	2	0	0	1	1	4
36	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
37	1	1	1	1	1	0	0	0	1	2
38	1	1	0	1	0	0	0	0	1	2
39	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
40	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Continuação da Tabela 5. Avaliação das amostras segundo a classificação de Horn et al.

n° Paciente	Inf int	Inf peri	Des ac	Dil duc	Fib	Met esc	Des duc	P cel duc	Ac muc	Grau
42	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
43	1	0	2	2	2	0	0	1	1	3
44	1	1	1	1	1	0	0	0	1	3
45	1	1	2	1	2	0	0	1	1	3
46	1	1	2	2	2	0	0	1	1	3
47	1	1	2	1	2	0	0	0	1	3
48	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
49	2	1	1	1	2	0	0	0	1	3
50	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
51	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2
52	1	1	2	2	2	0	0	0	1	4
53	1	1	2	0	1	0	0	0	1	3
54	1	1	3	2	2	0	0	1	1	4
55	2	1	2	2	2	1	0	0	1	3
56	2	1	2	1	2	0	0	0	1	3
57	1	1	2	1	2	0	0	0	1	3
58	1	1	3	0	2	0	1	1	1	4
59	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
60	2	1	2	0	1	0	0	0	1	3
61	2	1	1	0	1	0	0	0	1	3
62	2	1	2	0	1	0	0	0	1	3
63	2	1	1	0	1	0	0	0	1	3
64	1	1	1	0	1	0	0	0	1	3
65	2	1	2	0	2	0	0	0	1	3

Inf int: Inflamação intersticial, 0: ausente, 1: suave, 2: marcada; Inf peri: Infiltrado linfocítico periductal, 0: ausente, 1: presente; Des ac: Destruição acinar, 0: ausente, 1: leve, 2: difusa; Dil duc: Dilatação ductal, 0: ausente, 1: suave, 2: marcada; Fib: Fibrose intersticial 0: ausente, 1: suave, 2: marcada; Met esc: Metaplasia escamosa, 0: ausente, 1: presente; Des duc: Destruição de células ductais, 0: ausente, 1: presente; P cel duc: Proliferação das células ductais, 0: ausente, 1: presente; Ac muc: Acumulo mucoso, 0: ausente, 1: presente.