

Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

**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 biópsia de pele
Hemocentro/Unicamp**

Orientadora: Dra. Maria Leticia Cintra

Co-orientador: Dr. Konradin Metze



1999

Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

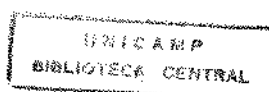
**A Mucosa Oral e Glândulas Salivares Acessórias na Doença
do Enxerto Contra o Hospedeiro crônica pós Transplante
de Medula Óssea: estudo prospectivo dos primeiros 63
transplantes de medula óssea;
Análise comparativa com parâmetros clínicos e biópsia de pele
Hemocentro/Unicamp**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências na área de Anatomia Patológica*

**Orientadora: Dra. Maria Leticia Cintra
Co-orientador: Dr. Konradin Metze**



1999



CM-00136239-7

C817m

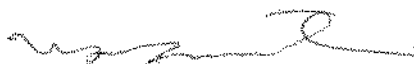
1. Mucosa bucal. 2. Glandulas salivares. 3. Medula óssea -
transplante. I. Maria Letícia Cintra. II. Konradim Metze. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Maria Leticia Cintra

Membros:

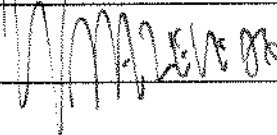
Profa. Dra. Maria Leticia Cintra



Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida



Prof. Dr. Wellington Moraes de Azevedo



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

Data: 05.02.1999

Dedicatória

Aos meus pais, Pedro e Irene pela enorme paciência e infinito apoio;

Aos meus irmãos, Pedro (Adriana) e Edson (Carla e Geórgia) por serem pessoas fantásticas;

À tia Clemência pelo incentivo e apoio constante,

E ao meu Baixinho, Cláudio, por quem tudo isso começou...

Agradecimentos

À Profª Dra. Maria Leticia Cintra, orientadora e e amiga, pelo constante incentivo, pela ajuda e confiança transmitida durante todo tempo de realização desse trabalho e por ser uma pessoa de força, otimismo e alegria ímpar.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, co-orientador, pelo inestimável auxílio na interpretação estatística do trabalho.

À coordenadoria do Hemocentro – UNICAMP, pela oportunidade de desenvolver o trabalho odontológico dentro desta casa e por mantê-lo viável aos pacientes.

Ao Dr. Wellington Moraes Azevedo, pioneiro dos transplantes alogênicos com células progenitoras periféricas no Brasil, pelo apoio sempre constante ao trabalho desenvolvido.

Aos médicos do TMO, Afonso Vigorito, Francisco Aranha, Kátia Eid e Alexandre M. Azevedo, responsáveis pelas rotinas fundamentais do Programa de TMO, pela paciência, pelo incentivo mas principalmente, pela amizade e confiança que depositam diariamente em nosso trabalho.

À equipe de enfermagem da enfermaria de TMO, pela capacidade técnica e pelo carinho com os pacientes.

À Margareth, terapeuta ocupacional e à Lucélia, assistente social da equipe de TMO, pela ajuda, pelo sorriso e estímulo.

À Milva e toda equipe de enfermagem do ambulatório de pós-TMO.

À Francis, pelo apoio em secretaria e à Eliana, pela organização de dados.

Aos docentes do Departamento de Anatomia Patológica do HC/ FCM/ UNICAMP, pela oportunidade e recepção ao nosso trabalho.

À Profª. Dra. Albina, à Profª. Dra. Ingrid e ao Prof. Dr. Elemir, pelas inestimáveis colaborações, críticas e idéias na confecção deste trabalho.

Aos médicos residentes do Departamento de Anatomia Patológica, e ao Amilcar, Telmo e Hugo, pelo auxílio com as leituras histopatológicas e amizade conquistada.

Aos técnicos dos laboratórios e à Maria do Carmo secretária da pós-graduação do Departamento de Anatomia Patológica.

À Raquel, à Malu, à Gislaine, à Margareth, à Carmen, à Maluzinha, ao Vagner, Marcelo e Fernando Lopes, para dizer que somente um obrigada não seria o suficiente... a amizade e o carinho de vocês são inestimáveis.

Ao Jacks, pela força, carinho e apoio dado durante todo esse tempo.

À Sandrinha e à Rosana, da Comunicação Social do Hemocentro, pela paciência durante a editoração de todo trabalho.

Aos médicos residentes do Hemocentro, pela amizade.

Enfim, obrigada a todos que participam comigo na realização diária de um grande sonho.

Epígrafe

O pensamento só começa com a dívida

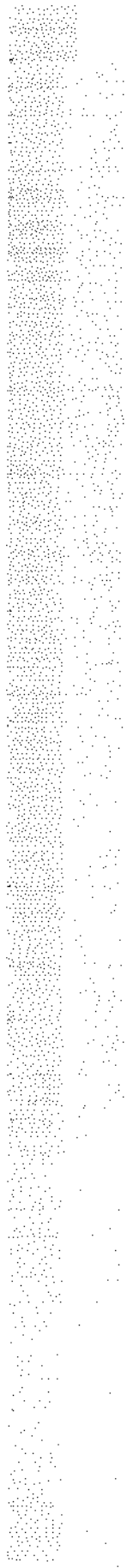
Roger du Gard

Lista de Abreviaturas

A	Ausência da GVHD
AA	Anemia aplástica
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BU	Bussulfano
CHM	Complexo de histocompatibilidade maior
CPP	Células progenitoras periféricas
CsA	Ciclosporina
CY	Ciclofosfamida
DIAGN	Diagnóstico
E	GVHD extensa
EPV	<i>Epstein Barr virus</i>
EXT	Extensão da manifestação clínica da GVHD
F	Sexo feminino
Fig	Fígado
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
G-CSFM	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos
GLD	Glândula salivar acessória
GVHD (a) (c)	<i>Graft-versus-host disease</i> (aguda) (crônica)
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IBMTR	<i>International Bone Marrow Transplant Registry</i>
ICT	Irradiação corpórea total
IDD	Idade
IV	Intra venoso
L	GVHD localizada
LL	Lesões liquenóides
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA (REFR)	Leucemia mieloide aguda (refratária)
LMC – (FC) (REC)	Leucemia mieloide crônica (fase crônica) (recaída)
M	Sexo masculino
MI	Material insuficiente
MO	Medula óssea
MTX	Metotrexato
MUC	Mucosa bucal
NIP	Número individual do paciente
P	Pele

PLQ	Número de plaquetas
PRED	Prednisona
PL	Pulmão
PUVA	Luz ultra violeta associado ao psoralen
REC	Recaída
SMD	Síndrome mielodisplásica
SS	Síndrome de Sjögren
TGI	Trato gastrointestinal
TMO	Transplante de medula óssea
TX	Tipo de transplante
UFC	Unidade formadora de colônia
VO	Via oral
VP	Vepeside
XER	Xerostomia

Resumo	i
Summary.....	iv
Introdução.....	1
História	2
Fases do Transplante de Medula Óssea.....	5
Complicações Relacionadas Diretamente com o Transplante	16
Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (graft versus host disease - GVHD).....	16
Manifestações Clínicas e Histológicas da GVHD Aguda (GVHDa).....	18
Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Fase Crônica	22
Manifestações Clínicas	25
Características Histológicas	26
Justificativa do Trabalho	48
Objetivos	49
Pacientes e Métodos.....	51
Avaliação do Dia +100.....	52
Avaliação Posterior ao Dia +100	53
Métodos Estatísticos	55
Resultados.....	56
Resultados no Dia +100.....	57
Resultados Histológicos.....	60
Valor Diagnóstico das Biópsias	63
Análises Univariadas dos Resultados Histológicos Frente à Curva de Sobrevida Kaplan-Meier.....	63
GVHD Crônico: Fatores Preditivos (dia 100).....	66
Resultados Posteriores ao Dia + 100	69
Exame Histológico pós Dia 100.....	70
Análise de Sobrevida Após a Segunda Biópsia.....	74
Análise dos Parâmetros Histológicos Quanto à Sensibilidade do Exame Para o Diagnóstico da GVHDc	78
Discussão	80
Conclusões.....	92
Referências Bibliográficas.....	94



Resumo

A Doença do Enxerto contra o Hospedeiro representa uns dos fatores de maior morbidade e mortalidade pós transplante alogênico de medula óssea (TMO). Lesões na cavidade bucal e em glândulas salivares menores são achados comuns na GVHDc, manifestando-se através de xerostomia e lesões liquenóides.

O objetivo deste trabalho foi estudar, prospectivamente, os aspectos clínicos e histopatológicos da mucosa bucal e glândulas salivares acessórias no dia +100 (coletados necessariamente, conforme protocolo) e no momento do diagnóstico da GVHDc feito posteriormente ao dia 100 pós TMO, para: avaliar a especificidade e sensibilidade da análise histopatológica protocolar do dia +100; estudar a frequência de acometimento da pele, mucosa bucal e glândula salivar na GVHD crônica; determinar os parâmetros clínicos associados à sobrevida pós transplante; determinar os parâmetros clínicos preditivos de GVHD crônica e determinar o valor da análise da mucosa bucal e glândula salivar acessória na sobrevida pós transplante de medula óssea.

Foram coletadas ao redor do dia +100, amostras de pele e mucosa bucal incluindo glândula salivar menor de 45 pacientes submetidos ao TMO alogênico HLA-idêntico. Uma segunda biópsia foi realizada em 25 pacientes que desenvolveram ou mantiveram sintomas sugestivos de GVHDc. As amostras foram analisadas e classificadas de acordo com o proposto por HORN (1995). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo modelo univariado da regressão de azares proporcionais de COX. Para avaliar as variáveis significativas em conjunto, foi utilizado o modelo multivariado de regressão de azares proporcionais de COX (regressão *stepwise*). Para análise de sobrevida foram construídas curvas de Kaplan-Meier.

Do total de 63 transplantes realizados no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hemocentro da Unicamp entre setembro de 1993 a maio de 1995, 45 pacientes entraram no estudo, por sobreviverem mais que 100 dias pós transplante. Todos os pacientes receberam transplante alogênico, HLA-idêntico. Desses 45 pacientes, 32 receberam enxertos coletados por aspiração da medula óssea (MO) e 13 por células progenitoras periféricas (CPP). Do grupo, 19 pacientes eram mulheres 26 homens, com idade mediana de 36 anos (4 – 57).

Os resultados do exame histológico no dia 100 não demonstraram valores preditivos para o diagnóstico para o GVHDc. O tipo de transplante realizado, CPP ($p=0,023$), a presença anterior da GVHD aguda ($p=0,0016$) e doadoras femininas para receptores masculinos ($p=0,031$) demonstraram ser fatores preditivos para a GVHD crônica. Em relação à sobrevida, o tipo de transplante, CPP ($p=0,017$), a antecedência da forma aguda da GVHD ($p=0,016$) e o nível sérico maior de ciclosporina ($p=0,0031$) foram correlacionados a um pior prognóstico.

A segunda biópsia foi realizada num intervalo entre 104 a 304 dias pós TMO (mediana de 195 dias). Dezoito pacientes apresentaram GVHDc extensa, 4 localizada e 3 não apresentaram GVHDc. Onze pacientes morreram depois da segunda avaliação, sendo que 7 por GVHDc, 3 por recaída da leucemia e

um por causa não relativa ao TMO. Nesse período, os achados histológicos positivos para GVHDc em mucosa bucal e glândula salivar menor foram estatisticamente significativos em relação à sobrevida dos pacientes. Os achados foram classificados em 3 grupos de gravidade da GVHDc, de acordo com a classificação de Horn (Grau I, II, III-IV). A mucosa bucal ($p=0,02$) e a glândula salivar menor ($p=0,009$) demonstraram ter valor preditivo para a sobrevida dos pacientes.

Apesar do pequeno número de pacientes, nossos dados sugerem que as biópsias protocolares no dia +100 não são adequadas ao diagnóstico de GVHDc. A glândula salivar revela com maior frequência a agressão linfocitária da GVHDc que a pele ou mesmo a mucosa bucal. A presença da fase aguda da GVHD, assim como doadoras femininas e o tipo de transplante realizado demonstraram ser fatores importantes no prognóstico menor de sobrevida. A GVHD aguda, assim como o tipo de transplante (CPP), e o sexo do doador (feminino) demonstraram ser importantes fatores preditivos de desenvolvimento da GVHD crônica. Os achados histológicos positivos para GVHDc em glândula salivar juntamente com os de mucosa bucal podem refletir em pior prognóstico (sobrevida).

Summary

Chronic graft-vs-host disease (cGVHD) is an important cause of morbidity and mortality after allogeneic bone marrow transplants. Lesions of the oral mucosa and salivary glands are common features of cGVHD, manifesting as xerostomia, lichenoid lesions or even severe mucositis. The biopsy of specimens of the oral mucosa, collected on day +100, is commonly used as a screening test for the diagnosis of cGVHD.

The aim of our study was to evaluate the screening test for diagnosis of cGVHD on day +100 post BMT, the predictive factors of diagnosis for cGVHD, the incidence of skin and oral cGVHD manifestation and the use of findings of the histological specimens as a predictor of shorter survival in patients with cGVHD.

Data were initially analyzed from 45 patients who had received unmodified allogeneic marrow grafts in the Bone Marrow Transplantation Hospital Service / Hematology and Hemotherapy Center of the State University of Campinas, UNICAMP, between September 1993 to May 1995 and who had survived for over 100 days. Of these 45 patients, 32 received grafts collected by aspiration (bone marrow - BM) and 13 peripheral bone progenitors cells (PBPC), from HLA-identical siblings. Biopsies of the skin and labial mucosa, including representative samples of minor salivary gland (MSG), were collected on day +100. A second biopsy was performed at a later time in 25 patients (BM=16, PBPC=9) who had developed or sustained signs or symptoms suggestive of cGVHD. All specimens were analysed by 2 examiners (MEPC and MLC) separately for later comparison. Horn pathological staging score was used for the histological classification of the oral and salivary gland findings. Univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models, and the Kaplan-Meier method were used to determine the overall survival.

Sixty-three allogeneic BMT were performed between September 1993 and May 1995 in the Bone Marrow Service of the Hemocentro / Unicamp. Forty-five patients survived for over 100 days and the histological findings were analysed. Of these patients, 32 received bone marrow transplantation (BMT) and 13 received peripheral bone progenitor cells (PBPC). Nineteen patients were women and 26 men and the median age was 36 years (4 – 57 years old).

The histological findings, obtained at the +100 day did not show any predictive value for cGVHD diagnosis. PBPC ($p=0,023$) transplant, acute GVHD ($p=0,0016$) and female donors ($p=0,031$) were predictive factors for cGVHD on the 100 day post BMT. The PBPC ($p=0,017$) transplant, acute GVHD ($p=0,0016$) and the level of cyclosporin ($p=0,0031$) were predictive factors for a worst prognosis of overall survival.

The second time biopsies were performed from 104 to 304 days after BMT (median 195 days). Eighteen patients showed extensive cGVHD, 4 localized cGVHD and 3 no form of cGVHD. Eleven patients died after the second biopsy, 7 due to cGVHD, 3 due to leukemia relapse and one due to no transplant reason. The skin histological findings did not show any prognostic value. The results of

histological oral mucosa and minor salivary gland findings showed statistical importance. We stratified patients into three groups of scale cGVHD severity, using the HORN pathological staging score (I, II and III-IV). For oral mucosa, the statistical value was $p=0,02$ for and the minor salivary gland it was $p=0,009$.

Despite the small number of patients, our results suggest that severe histologic lesions in MSG specimens obtained beyond day +100 correlate with higher mortality in patients suffering from cGVHD. There is a greater frequency of lymphocyte infiltration in minor salivary gland than in the oral mucosa or skin. The histological findings on the 100 day after BMT, did not show any prognostic value for diagnosis of cGVHD. The female donors and the type of transplantation showed important value in the prognostic for overall survival for BMT patients. The aGVHD, the BMT type and the sex of the donor were important factors for prognostic of cGVHD.

[illegible]

História

Desde o final da década de 40, inicialmente por consequência da bomba atômica no Japão, notou-se que os indivíduos que foram expostos a essa irradiação, em pouco tempo desenvolviam falência medular com pancitopenia de êxito letal posterior (SANTOS, 1983).

Posteriormente, JACOBSON *et al.*, (1951) e LORENZ *et al.* (1951) mostraram que roedores poderiam sobreviver a doses superletais de irradiação se o baço, órgão hematopoético no camundongo, obtivesse proteção através de placas de chumbo ou se células provenientes do baço ou da medula de um animal sadio, fossem infundidas logo após a irradiação. Estudos subseqüentes estabeleceram que essa proteção se devia à repopulação da medula do hospedeiro por células do doador e não pela presença de um "fator humoral" produzido pelo baço, como se pensou inicialmente (STORB *et al.*, 1994).

Trabalhos posteriores em roedores, demonstraram que, aqueles em que a hematopoese havia sido reconstituída por infusão de medula, eram capazes de aceitar enxertos de pele do mesmo "doador". Paralelamente, estudos em citogenética vieram demonstrar que os leucócitos do camundongo "transplantado" eram geneticamente idênticos aos do seu doador (STORB *et al.*, 1994).

Outro dado importante encontrado em observações iniciais, foi o desenvolvimento de uma nova doença, naqueles camundongos transplantados com uma medula geneticamente não idêntica, que foi caracterizada por alterações epiteliais, associadas a diarreia e a anormalidades hepáticas, posteriormente denominada de Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (*graft-versus-host disease - GVHD*) (van BEKKUM e deVRIES, 1967).

O descobrimento gradual do complexo HLA (*human leucocyte antigen*) e dos antígenos de histocompatibilidade, através de estudos realizados em cães, que possuem um complexo de

histocompatibilidade maior (CHM), chamado *dog leucocytes antigens* (DLA) (ALBERT *et al.*, 1973), juntamente com o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras, permitiram que as técnicas de transplante de medula óssea (TMO) evoluíssem rapidamente, culminando com os primeiros transplantes realizados em humanos, na década de 50 (THOMAS *et al.*, 1975 (A), (B); BACH e vanROOD, 1976 (A), (B), (C); SANTOS, 1983). Esses foram inicialmente desastrosos pois foram realizados em pacientes terminais onde muitos evoluíram para óbito ou mesmo para desenvolvimento de GVHD grave, infecções fúngicas e virais fatais (MATHE *et al.*, 1967; BORTIN, 1970).

Nos anos posteriores, o advento de novas drogas imunossupressoras e citotóxicas e a possibilidade da utilização de cães com tipagens teciduais conhecidas para experimentos, impulsionaram ainda mais o estudo do TMO, que entrou em sua fase moderna, na década de 70, com a introdução da ciclosporina como agente imunossupressor (STORB *et al.*, 1969).

Atualmente, o TMO tem sido indicado como medida terapêutica para diversas doenças hematológicas ou de outros tecidos, insuficiências medulares ou outros distúrbios congênitos da hematopoese.

Definições Gerais

O TMO pode ser classificado segundo diversos parâmetros:

1. Quanto ao tipo de doador:

- alogênico: entre indivíduos diferentes, mas do mesmo gênero.
- singênico: entre indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos univitelinos)
- autólogo: quando é utilizada a medula do próprio paciente

Nota: A sigla GVHD é amplamente usada e aceita pela literatura internacional e usualmente utilizada em nosso meio quando se refere à doença do enxerto-contra-hospedeiro. Portanto, optamos por utilizá-la (em inglês) durante todo o trabalho.

2. Quanto ao grau de parentesco:

- aparentado: entre parentes de primeiro grau apenas;
- não aparentado: não há vínculo familiar de primeiro grau mas há semelhanças no HLA

3. Quanto à semelhança (disparidade) HLA:

- HLA compatível: há semelhanças entre os haplótipos do doador e receptor;
- HLA incompatível: há diferenças nos antígenos de histocompatibilidade entre doador e receptor.

4. Quanto à fonte de células progenitoras

- Medula Óssea: o doador é submetido* a anestesia geral e, em centro cirúrgico, são feitas aspirações da medula da crista ilíaca
- Células Progenitoras Periféricas (CPP): é feita a mobilização das células progenitoras (“*stem cells*”) do doador através da administração de fatores estimuladores de colônia de granulócitos ou granulócitos-macrófagos (G-CSF ou GM-CSF), com posterior coleta no sangue periférico através de aféreses (AMOS & GORDON, 1995).

Indicações

O TMO é indicado basicamente para três situações:

1. restituir um componente hematopoético ou linfóide ausente;
2. restituir as células hematopoéticas danificadas secundariamente a diferentes fatores relacionados aos regimes antineoplásicos intensos utilizados no tratamento da leucemia;
3. permitir a substituição da hematopoese alterada

*Nota do Autor: o termo “submeter” será empregado no sentido de “levar a”, “tratar com” e não como uma ação restritiva.

Fases do Transplante de Medula Óssea

Condicionamento

O programa de condicionamento tem como objetivo básico estabelecer um grau de imunossupressão suficiente para que o enxerto não seja destruído pelas células imunocompetentes do receptor, destruir um número máximo de células neoplásicas residuais do receptor e criar, dessa forma, um “espaço” onde a nova medula possa proliferar (STORB *et al.*, 1994).

Vários são os regimes de condicionamento propostos. A irradiação corpórea total (ICT) foi amplamente utilizada nos programas de TMO. Inicialmente estudado em cães o condicionamento através da ICT trouxe várias complicações de toxicidade relativa à alta dosagem de irradiação. Posteriormente, se obtiveram cães com quimera completa (ou seja, células da medula e do sangue periférico com características do doador), com doses fracionadas da irradiação, com menores efeitos colaterais (STORB *et al.*, 1986). Mesmo em doses fracionadas, a toxicidade da ICT estabelece efeitos precoces e tardios, que incluem náusea, mucosite, diarreia e até alterações de crescimento, alterações endócrinas, pulmonares e carcinogénicas (BANDINI *et al.*, 1994).

Em estudos posteriores, em ratos e macacos com agentes alquilantes (ciclofosfamida) se observou a ação dessa droga na mielossupressão, e esta começou a substituir a ICT. Derivados do dimetilbussulfano, começaram a ser estudados em cães com êxito na “*pega*” do enxerto nesses animais (STORB *et al.*, 1977). SANTOS *et al.*, (1983), descreveu um esquema de condicionamento utilizando o bussulfano em substituição à ICT associado à ciclofosfamida, enquanto TUTUSCHKA *et al.* (1987) descreveu um esquema de condicionamento pré TMO, utilizando baixas doses das drogas vindo assim, substituir o condicionamento com ICT para algumas doenças, trazendo menores efeitos colaterais (Tabela 1).

Profilaxia para GVHD aguda

A utilização da associação entre ciclosporina e metotrexato ou ciclosporina e prednisona como esquemas imunossupressores logo após o TMO, têm se mostrado efetiva na profilaxia para GVHD agudo (YAU *et al.*, 1990). No Serviço de TMO da Unicamp, o esquema utilizado inclui o MTX no dia +1, +3, +6 e +11 e CsA à partir do dia -1 até o dia +70 com gradual diminuição da dose se não houver manifestação de GVHD a partir do dia +70 pós-TMO (5% por semana). Nos portadores de AA, a retirada é mais tardia e lenta. A Tabela 1 sumariza as drogas utilizadas no regime de condicionamento:

Tabela 1. Esquema de condicionamento/profilaxia utilizados no TMO e na GVHD

Doença	Condicionamento	Profilaxia GVHD
Não neoplásica	BU / CY	CsA - MTX
	Ou	
	CY	
Doença neoplásica	BU / CY	CsA - MTX
	Ou	CsA - Pred
	BU-VP-CY	

TMO=transplante de medula óssea; GVHD="graft versus host disease";BU= bussulfano, CY= ciclofosfamida, VP = etoposide, CsA = ciclosporina, MTX = metotrexato, PRED = prednisona;

Citotoxicidade Relativa à Ação Quimioterápica

A eficácia do agente antineoplásico é baseada, primeiramente, na sua capacidade de interferir no metabolismo ou no ciclo reprodutivo de células tumorais, com a finalidade de destruí-las, com o menor índice de toxicidade secundária possível.

Muitas das drogas quimioterápicas possuem a habilidade de interferir em ciclos específicos da reprodução celular (ciclo-dependentes) e outras são capazes de interagir em qualquer fase da divisão mitótica (ciclo-independentes). Durante o tratamento, muitas dessas drogas são utilizadas de forma conjunta, com o objetivo de atingir a neoplasia em todas as fases de crescimento. No

emprego dessas drogas, de maneira isolada ou conjunta, além dos efeitos esperados sobre as células tumorais, ocorrem outros efeitos tóxicos que influenciam o resultado do tratamento. Além da alopecia, diarreia, a mucosite é um dos efeitos secundários à citotoxicidade de maior morbidade para o paciente (WILLIAN *et al.*, 1977). PERRY *et al.*, (1982) classifica as alterações relacionadas à quimiotoxicidade em imediata, precoce, retardada e tardia, segundo a tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da toxicidade quimioterápica

	Comum a várias agentes	Específicas de algumas drogas
IMEDIATA (após horas)	Náusea/vômito; necrose tecidual local; flebite, falência renal; anafilaxia, "rash" cutâneo	Cistite hemorrágica; hipocalcemia; eritema facial, febre/frio
PRECOCE (dias ou semanas)	Leucopenia; trombocitopenia; alopecia; estomatite, diarreia, megaloblastose	Hipercalcemia, psicoses, coagulação intravascular disseminada, pancreatite, retenção hídrica, infiltrado pulmonar, ataxia cerebelar, ototoxicidade
RETARDADA (semanas ou meses)	Anemia, azoospermia, hepatopatias, hiperpigmentação, fibrose pulmonar	Neuropatia periférica, necrose cardíaca, síndrome cushingóide, masculinização, feminização, colestase hepática, síndrome de Addison-simile
TARDIA (meses ou anos)	Esterilidade, hipogonadismo, leucemia aguda, tumores sólidos, outras doenças malignas secundárias	Fibrose hepática, encefalopatia, carcinoma de bexiga, osteoporose

toxicidade medicamentosa, segundo PERRY et al., 1982

Complicações na Pele

Com o desenvolvimento de diferentes protocolos de condicionamento, incluindo variadas formas de associação de drogas, as alterações cutâneas clínicas e histológicas apresentadas por esses pacientes são de difícil diagnóstico por se assemelharem às erupções provocadas por outras drogas, reações adversas por hemoderivados e exantemas virais, bacterianos ou fúngicos. Estas reações são classificadas segundo a forma de resposta envolvida em citotóxica ou de hipersensibilidade. Muitos agentes citotóxicos apresentam afinidade por alvos específicos como folículos pilosos, glândulas sudoríparas, células endoteliais, etc., podendo haver influência da via de administração. Similarmente, reações mediadas imunologicamente são observadas com diversas

manifestações clínicas e histológicas. FITZPATRICK, (1993) descreve as alterações epidérmicas relacionadas à quimioterapia em precoce ou leve, intensa e crônica, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Características histológicas das alterações epidérmicas durante o período de quimioterapia

Formas	Características Histológicas
Precoce ou leve	Alteração vacuolar da camada basal, ceratinócitos necróticos basais ou mais superficialmente
Intensa	Destruição da camada basal, podendo haver clivagem ou verdadeiras bolhas subepidérmicas
Crônica	Maturação anormal dos ceratinócitos, que se apresentam grandes, multinucleados, com núcleo e nucléolo aumentados, até a superfície, epiderme atrófica pela formação quantitativa anormal das células basais.

FITZPATRICK, 1993

Toxicidade Cutânea

Alterações cutâneas em pacientes que utilizam quimioterápicos, são frequentes e de patogênese variada. A associação de drogas quimioterápicas, a radioterapia em qualquer período do tratamento, o uso de hemoderivados e de outras drogas, dificultam o diagnóstico das alterações cutâneas, tanto clínica como histologicamente. Muitos agentes citotóxicos têm afinidades teciduais específicas, como para o bulbo pilar, glândulas sudoríparas, células endoteliais, etc. As células epiteliais, por apresentarem alto grau de renovação celular, são particularmente atingidas pela administração das drogas quimioterápicas. Assim, surgem alterações nos ceratinócitos relacionadas às drogas ciclo-dependentes ou como resposta citotóxica e/ou de hipersensibilidade. Essa reação está diretamente relacionada à capacidade de metabolização da droga e de outros possíveis fatores individuais (FITZPATRICK, 1993). As drogas frequentemente relacionadas à toxicidade cutânea imunologicamente mediada, são o bussulfano (HYMES, *et al.*, 1985), citarabina (HERZIG, *et al.*, 1983), bleomicina (WERNER, *et*

al., 1976), hidroxiuréia (KENNEDY, *et al.*, 1975), etoposide (YOKEL, 1987) e metotrexato (FITZPATRICK, 1993). As lesões aparecem após as primeiras 24 horas da infusão e próximas ao local de administração, com um eritema focal ou difuso, que inicialmente possui a mesma característica de uma “queimadura solar” e que pode evoluir para necrólise epidérmica tóxica, eritema multiforme ou até o eritema pigmentar fixo (KOEHN, *et al.*, 1982, SPENCER, 1984, ARIAS, *et al.*, 1991). Diferentemente das outras lesões mediadas imunologicamente, a lesão primária por quimioterapia é dolorosa e não pruriginosa, freqüentemente associada com estomatite (posteriormente descrita), podendo evoluir para a descamação e cura ou formar bolhas com posterior desnudamento dérmico (FITZPATRICK, 1993).

O eritema acral pode ser deflagrado pela doxorrubicina (BUGDORF, *et al.*, 1982), metotrexato (DOYLE, *et al.*, 1983), hidroxiuréia (SILVER, *et al.*, 1983), citarabine (LEVINE, *et al.*, 1985), 5-fluoracil (FELDMAN, *et al.*, 1985) e pelo mercaptopurine (COX, *et al.*, 1986). Clinicamente, o paciente apresenta sensação de “queimação” nas mãos e pés precocemente no curso da quimioterapia, podendo evoluir para eritema nas regiões palmar, plantar, articular (dedos), cabeça, área periungueal e desenvolver edema. Em casos mais graves, podem-se formar bolhas. O mecanismo envolvido na distribuição dessa manifestação não é bem conhecido, mas postula-se que pode estar relacionado a diferenças anatômicas, como a ausência de folículos sebáceos nas palmas e plantas, estrato córneo mais espesso e papila dérmica proeminente (COX, *et al.*, 1986). A análise histológica demonstra uma dermatite de interface pouco povoada por infiltrado mononuclear (Figuras 1 e 2). Outras estruturas também podem estar envolvidas nesse processo, como glândulas écrinas e seus ductos.

As reações ao tratamento radioterápico aparecem em 1 a 3 semanas, normalmente desencadeadas pelo uso associado da bleomicina, doxorrubicina, hidroxiuréia, fluoracil e metotrexato (BRONNER, *et al.*, 1983). Clinicamente se caracterizam por aumento do eritema

regional, radiodermite, formação de vesículas ou ulcerações. Quando o intervalo entre a quimioterapia e a radioterapia é curto, a chance do aparecimento das reações é maior. Contudo, reações à radioterapia podem surgir após 15 anos do tratamento (BURDON, *et al.*, 1978). O metotrexato pode desencadear reação similar em região previamente exposta ao sol (KOROSSY, *et al.*, 1981).

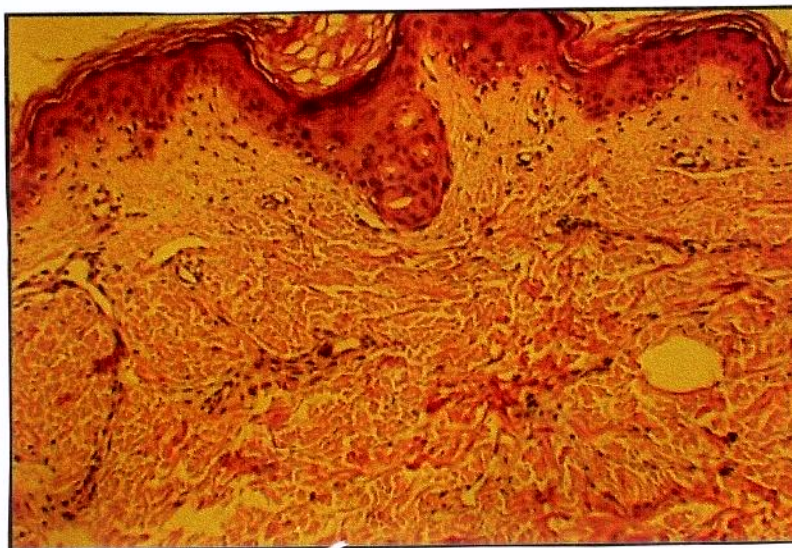


Figura 1. Corte de pele com sinais morfológicos do condicionamento pré-transplante de medula óssea. A epiderme acha-se adelgada, hiperpigmentada e os núcleos dos ceratinócitos são volumosos tanto na profundidade como na superfície (H&E, aumento original x 125)

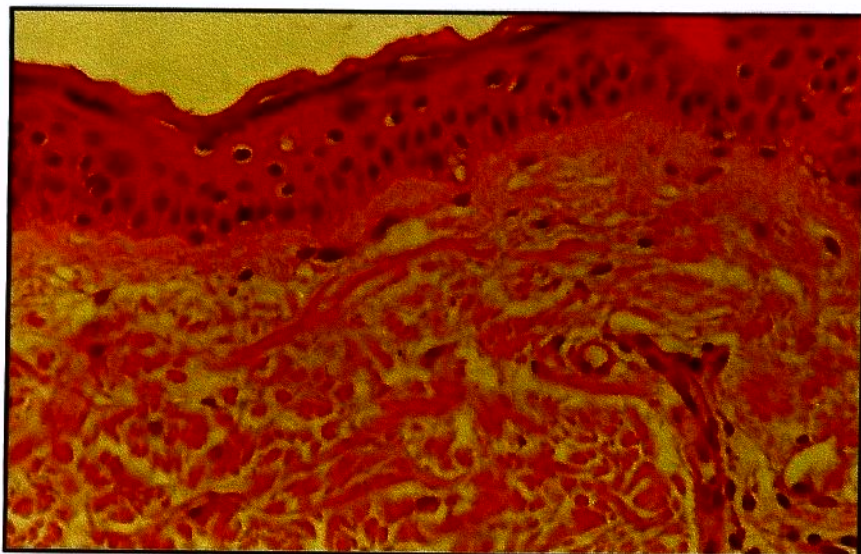


Figura 2. Corte de pele com sinais morfológicos do condicionamento pré-transplante de medula óssea. Nota-se retificação dos cones epiteliais, degeneração hidrópica da camada basal da epiderme, núcleos aumentados de volume, com certo grau de atipia e perda da polaridade (H&E, aumento original x 312).

Folículos Pilosos

Alopecia como consequência do tratamento quimioterápico, é um dos efeitos tóxicos cutâneo de maior incidência. Normalmente, as células dos bulbos pilares dobram em número a cada 24 horas. O efeito citotóxico é verificado através do afinamento e fragilidade da haste pilar e da sua queda, pela parada do crescimento celular, sendo na maioria das vezes temporário (COHEN *et al.*, 1973; KENNEDY, 1975; HRUSHESKY, 1976; DUNAGIN, 1984).

Alterações Melanocíticas

Alterações pigmentares são encontradas quer na forma de hiper (ciclofosfamida, bussulfano e 5-fluoracil) ou de hipopigmentação da pele e mucosas, com diferentes apresentações clínicas, parecendo haver mais de um mecanismo envolvido nesse processo. O bussulfano provoca um escurecimento da pele, simulando a doença de Addison, reversível com a suspensão da medicação. À microscopia eletrônica, as alterações provocadas pelo bussulfano estão relacionadas com efeitos tóxicos em melanócitos, tais como diminuição das mitocôndrias, vacúolos citoplasmáticos e conglomerados de massas de melanossomas (ADAM *et al.*, 1980).

Outros achados sugerem que os efeitos tóxicos isolados dão origem a “melanócitos fantasmas” e incontinência pigmentar para a derme papilar. Apesar das reações tóxicas, há um aparente aumento de melanossomos nos ceratinócitos, sugerindo que há uma estimulação compensatória na produção de melanina (ADAM *et al.*, 1980).

Outras Alterações Cutâneas

Outras reações, como nas decorrentes do extravasamento local de quimioterápicos, promovendo necrose tecidual e celulite, as reações vasculares, nas glândulas sudoríparas, écrinas e apócrinas também podem ser observadas.

Alterações na Mucosa Oral

Cerca de 40% dos pacientes em tratamento quimioterápico e/ou em regime de condicionamento para TMO apresentam mucosite (SONIS *et al.*, 1978) (Figura 4). Essa alteração está relacionada com os efeitos inibitórios não específicos dos agentes quimioterápicos nos tecidos com rápida divisão celular, como a mucosa oral. Conseqüentemente, a renovação epitelial está reduzida, resultando em alterações tróficas com eventuais ulcerações (GUGGENHEIMER *et al.*, 1977). Em pacientes tratados pelo TMO, a mucosite começa a ser evidenciada ao redor do 10º dia

após o início do condicionamento (LOCKHART *et al.*, 1981). O pico ocorre entre os dias 7 e 11 após o término da quimioterapia, podendo durar de 2 a 3 semanas (mcGUIRE *et al.*, 1993). É causa de considerável morbidade e inclui dor, hemorragias e infecções (Figura 5). O paciente começa a descrever sensação de “ardência” bucal, seguida do aparecimento de eritema, erosão e ulceração. A presença de ulceração coincide com o período de maior neutropenia e acarreta risco ao paciente devido à facilidade de infecções fúngicas, bacterianas ou virais (mcGUIRE *et al.*, 1993). Desenvolve-se com maior frequência nos epitélios não ceratinizados como da mucosa jugal, mucosa labial, do palato mole, do ventre lingual e mucos do assoalho oral (PETERSON, 1984). Em estudo experimental, SHKLAR *et al.*, (1966) administrou metotrexato subcutâneo em hamster, durante 3 semanas, causando eritema em mucosa bucal, observando alterações histológicas caracterizadas por degeneração do colágeno e atrofia epitelial, sem desenvolvimento de ulceração. SONIS *et al.*, (1990) também em estudo com animais, demonstrou alterações clínicas e histológicas produzidas pela infusão de 5-fluouracil, encontrando eritema após o 3º dia de infusão e formação de abscessos em áreas sujeitas a traumas, ulceração e necrose após o 7º dia, mucosite generalizada em 10 dias e cicatrização completa após o 16º dia. Os primeiros foram coincidentes com o período de maior neutropenia dos animais. Histologicamente, dividiu os achados em 2 fases: precoce e tardia:

Precoce: 2 - 5 dias:

- paraceratose e áreas de degeneração hidrópica da camada basal;
- dilatação de capilares do cório, com acúmulos eritrocitários;
- infiltrado linfocitário e de macrófagos, com distribuição peri-vascular;
- infiltrados polimorfonucleares ocasionais, com áreas de abscesso.

Tardia:

- epitélio escamoso estratificado com áreas de paraceratose, degeneração hidrópica e necrose por liquefação do estrato germinativo;
- numerosos capilares dilatados, degeneração do colágeno e infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos, em pouca quantidade (coincidindo com o período de maior neutropenia);
- áreas extensas de necrose do tecido conectivo, focos de infecção com colônias de microorganismos e epitélio necrótico.



Figura 4. Alterações bucais relacionadas à quimioterapia (mucosite). Edema labial (provavelmente associada à infecção herpética), ulceração em borda lingual e atrofia das papilas linguais. O esbranquiçado em dorso lingual não está correlacionado à presença de candidíase

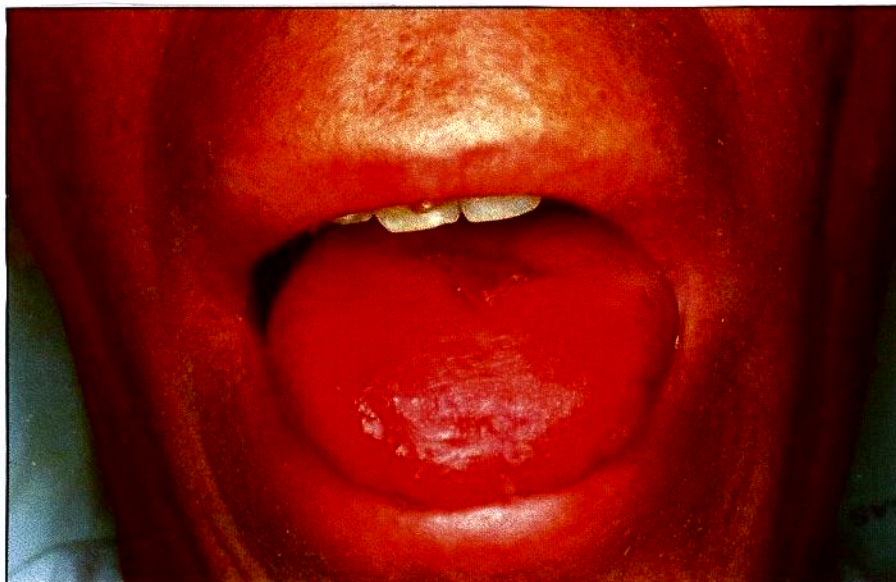


Figura 5. Alterações bucais relacionadas à quimioterapia (mucosite). Despapilação lingual e infecção herpética associada (herpes simples)

LACKHART *et al.* (1981) estudou 120 necrópsias de 30 pacientes tratados com vários protocolos de quimioterapia, para diversas doenças neoplásicas, cujos óbitos se deram em períodos distintos do tratamento. Os fragmentos foram removidos da mucosa jugal, labial, ventre lingual, assoalho oral, palato mole, gengiva e rebordo dentado, sendo avaliados para as seguintes alterações histopatológicas:

- atrofia, hiperplasia epitelial, displasia, paraceratose, degeneração do colágeno e de glândulas salivares,
- diminuição do número de figuras de mitose, edema e alterações do número de células inflamatórias.

Os resultados foram ainda correlacionados com a idade, o sexo, duração da quimioterapia, grau e duração da neutropenia, tipo de neoplasia, tipo de quimioterápico, contagem de glóbulos brancos e história clínica de mucosite ou ulcerações. Os autores demonstraram correlação entre o tempo de neutropenia e a incidência e grau de complicações orais relativos à mucosite. Idade, tipo de doença, estado nutricional e a existência prévia de lesões orais, poderiam predispor ao aparecimento da complicação. O tipo, intensidade e duração da quimioterapia, associados a trauma dentário, causado pela existência de dentes com bordas cortantes, representaram fatores contributivos. A hiperplasia epitelial (principalmente encontrada em áreas como a gengiva e o dorso da língua), associada à presença de microorganismos, assim como a degeneração do colágeno, foram os achados histológicos mais comuns. Displasia e alterações tróficas seguidas de ulcerações também foram observadas na grande maioria dos espécimes. A degeneração das glândulas salivares foi encontrada principalmente naquelas localizadas em lábio, mucosa jugal, língua e assoalho oral. Não houve correlação entre os achados histológicos e o curso clínico das complicações bucais podendo refletir a natureza transitória desses achados clínicos. Parece claro que as alterações histológicas orais em pacientes que recebem tratamento quimioterápico são variadas e não estão confinadas ao epitélio somente, demonstrando também a participação da submucosa na histogênese da mucosite e ulceração.

Complicações Relacionadas Diretamente com o Transplante

Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (graft versus host disease - GVHD)

A identidade imunológica individual se expressa através das proteínas de superfície ligadas ao complexo de histocompatibilidade maior humano (CMH) chamado de *human leucocytes antigens* (HLA). Antígenos CMH e os de compatibilidade menor (não-CMH) são expressos em

tecidos que, ao serem transferidos de uma pessoa a outra, normalmente são reconhecidos como estranhos pelo receptor (FERRARA *et al.*, 1991).

A GVHD (*graft-versus-host disease*) é definida como uma síndrome com características de imunodeficiência sendo iniciada por estímulos antigênicos. As células T da medula inoculada reconhecem os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro como não *self*. Os linfócitos T sensibilizados, proliferam e iniciam um ataque às células teciduais do hospedeiro, produzindo características clínicas da GVHD na pele, no intestino e no fígado (STORB *et al.*, 1994).

De acordo com a descrição clássica de BILLIGHAM (1966), a GVHD necessita de três eventos para sua iniciação:

1. diferenças de histocompatibilidade, geneticamente determinadas, entre o doador e o receptor;
2. presença de células imunocompetentes no enxerto, capazes de reconhecer como estranhos os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro, deflagrando assim, uma reação imunológica contra o hospedeiro;
3. o hospedeiro ser incapaz de reagir contra o processo desencadeado.

De acordo com esse critério, a GVHD pode ser desenvolvida em várias situações clínicas, quando tecidos que possuam células imunocompetentes, como sangue, medula e alguns órgãos sólidos, são transplantados ou infundidos entre pessoas (FERRARA *et al.*, 1991).

A GVHD é usualmente dividida em dois estágios: fase aferente, onde ocorre a exposição e reconhecimento de antígenos específicos através das células T do doador (RAMSDELL *et al.*, 1989). A fase eferente onde se inicia a destruição das células-alvo (*target cells*) principalmente as células epiteliais da pele, dos ductos intra-hepáticos e do intestino. A microscopia eletrônica e estudos imunohistoquímicos demonstram a presença de infiltrado linfocitário em biópsia de pele humana. Linfócitos CD8⁺ foram encontrados em biópsia de lábio de pacientes com GVHD.

Células *natural killer* (NK) também foram encontradas em estudo animal e em humanos, assim como mediadores (fator de necrose tumoral- α (TNF- α)) que estão presentes na fase eferente da GVHD (TAKATA *et al.*, 1993).

A principais células-alvo para a GVHD são encontradas em subregiões do epitélio, onde estão as células progenitoras epiteliais ou as menos diferenciadas, como nas criptas da mucosa intestinal e cripta da mucosa intestinal e do bulbo de folículos pilosos (MURPHY *et al.*, 1990). No fígado, os ductos biliares são o principal alvo na GVHD, associando-se colestase hepática (SHULMAN & Mc DONALD, 1984).

A GVHD também pode ser observada entre pessoas geneticamente idênticas (transplantes singênicos) ou em transplantes autólogos (RAPPEPORT *et al.*, 1979; THEIN *et al.*, 1981). Esse achado fez com que o segundo postulado de BILLIGHAN fosse revisto, onde foi acrescentada a hipótese do reconhecimento inapropriado dos antígenos do próprio hospedeiro (*self*), caracterizando assim, um processo auto-imune relacionado à síndrome do enxerto contra o hospedeiro (MARTI, 1994; VOLGESANG *et al.*, 1988).

Manifestações Clínicas e Histológicas da GVHD Aguda (GVHDa)

A incidência da GVHD aguda no TMO alogênico varia de 10% a 80% dos transplantes, dependendo do grau de histocompatibilidade, idade do paciente e o regime de profilaxia instituída (DEEG *et al.*, 1990). Doadoras femininas para receptores masculinos ou mesmo femininos estão correlacionadas com uma maior incidência da GVHD aguda, quer pela sensibilização pós-gravidez (da doadora) ou pelas diferenças de histocompatibilidade menor, relacionadas com o cromossomo Y (STORB *et al.*, 1977; ATKINSON *et al.*, 1986). Em pacientes com menos de 20 anos de idade é de aproximadamente 20%. Em contraste, a incidência em pacientes com idade entre 45-50 anos é de 30% e em pacientes mais idosos, de 79% (VOLGESANG *et al.*, 1988).

Os principais órgãos-alvos são o sistema imune, a pele, o fígado e o intestino. A GVHD se manifesta clinicamente na pele como um “*rash*” maculopapular com prurido, inicialmente nas palmas das mãos, plantas dos pés, orelhas e freqüentemente atinge todo o corpo podendo formar bolhas que, ao se romperem causam descamação nos casos mais graves, semelhante à necrólise epidérmica tóxica (Síndrome de Lyell) (Figura 6). (PECK *et al.*, 1972). Sintomas gastrointestinais incluem anorexia, náusea, diarreia e dores abdominais. (VOLGELSANG *et al.*, 1988; FERRARA, *et al.*, 1991).



Figura 6. GVHD aguda. Descamação da pele, semelhante à epidermólise necrótica (Síndrome de Lyell)

BARRET *et al.*, (1984) descreveu manifestações bucais da GVHD aguda em 5 pacientes. Os sinais clínicos encontrados eram pápulas que apareceram entre os dias 21 ao 43º dias pós TMO, lesões liquenóides e lesões descamativas (12 a 24 dias pós TMO).

A GVHD aguda resulta em retardo na recuperação imunológica do paciente (muitas vezes associado às drogas imunossupressoras utilizadas para o controle da GVHD), com persistência da imunossupressão e aumento da suscetibilidade à infecções (FERRARA, *et al.*, 1991).

Diagnóstico Histológico

Devido à sua representatividade e à facilidade de acesso, a biópsia de pele é recomendada como auxílio diagnóstico da doença aguda. Alterações histológicas relativas à quimiotoxicidade e infecções virais ou bacterianas podem dificultar o diagnóstico histológico da GVHD aguda (BOMBI *et al.*, 1992).

Histologicamente, é caracterizada por dermatite de interface com alterações na camada basal, reação liquenóide envolvendo a epiderme, folículos pilosos, ductos sudoríparos e vasos superficiais. Usualmente a epiderme, assim como as unidades pilares são envolvidas simultaneamente (BOMBI *et al.*, 1992). Muitas classificações foram propostas para determinar graus de intensidade do envolvimento cutâneo na síndrome. A classificação utilizada é a de LERNER *et al.*, (1974) (Tabela 4). O autor classifica as alterações histológicas, como demonstrado na Tabela 4. BOMBI *et al.*, (1992) (Tabela 5), modificou a de LERNER, e salientou a presença de corpos apoptóticos na derme, a partir do grau II de sua classificação. SHULMAN *et al.*, (1984), confirmaram esse achado, através de estudo ultraestrutural, onde relatou que essas células necróticas consistiam não só de ceratinócitos, mas também de células dendríticas, como melanócitos e células de Langerhans. Como muitas células demonstraram ausência total de núcleo, BOMBI *et al.* (1992) denominaram-nas de “corpos eosinófilos”. Essas células acham-se envoltas por um ou mais linfócitos, aparentando uma imagem de satélite, a qual é denominada “satelitose linfocitária”, admitindo-se que a morte celular seja causada por ação direta desses linfócitos (BOMBI *et al.*, 1992). O envolvimento de ductos de glândulas sudoríparas ocorre em

cerca de 80% dos casos de GVHDa (AKOSA *et al.*, 1990), sendo semelhante ao encontrado na epiderme, com degeneração e/ou hipoplasia de células basais, mais acentuado em ducto distal (BOMBI *et al.*, 1992). Os danos são limitados às células basais dos ductos e, provavelmente apenas naquelas com atividade proliferativa. Esses achados suportam a hipótese de que somente as células epiteliais indiferenciadas com antígenos superficiais “primitivos” (células progenitoras), possam ser um alvo na GVHDa (SALE, 1990; BOMBI *et al.*, 1992). Envolvimento dos vasos superficiais também tem sido demonstrado, concomitantemente a alterações epiteliais iniciais da GVHDa (grau II de BOMBI) observando-se infiltrado linfocitário na camada íntima, acúmulo de material basófilo decorrente da fragmentação nuclear na região peri-vascular, extravasamento peri-vascular de F-VIII e proliferação vascular (SVILAND L *et al.*, 1991).

Tabela 4. Alterações histológicas da GVHDa na pele, segundo LERNER

Características histológicas	
GRAU I	Degeneração vacuolar da camada basal e acantose
GRAU II	Degeneração vacuolar com espongiose e disceratose
GRAU III	Desnudamento e formação de bolhas subepidérmicas
GRAU IV	Desnudamento da derme

características histológicas da GVHDa segundo LERNER et al., (1974)

Tabela 5. Alterações histológicas da GVHDa na pele, segundo BOMBI

Grau	Características histológicas
I	Vacuolização focal de células basais, infiltrado mononuclear discreto ao redor de vasos superficiais
II	Necrose de ceratinócitos basais ou suprabasais, acompanhada das alterações do grau I, presença de corpos eosinófilos com satelitose linfocitária
III	Aumento dos danos na camada basal com extensa necrose de ceratinócitos, até formação de clivagem dermoepidérmica e infiltrado inflamatório importante
IV	Aumento da necrose e clivagem dermo-epidérmica, semelhante à encontrada na necrólise epidérmica tóxica

segundo BOMBI et al., 1992

Profilaxia e Tratamento para a GVHD Aguda

O uso conjunto de metotrexato (MTX) e ciclosporina (CsA) tem sido utilizado durante as duas últimas décadas como agentes imunossupressores na prevenção da manifestação aguda da GVHD. A remoção das células T do enxerto (depleção das células T) tem sido empregada em vários centros de transplante de medula como meio de diminuição da incidência da GVHD aguda, mas está correlacionada à alta incidência de recaídas pós-transplante (ausência do efeito *GVL* – *graft versus-leukemia*, enxerto-contra leucemia), falências de enxerto, outros tumores e outras doenças linfoproliferativas associadas ao vírus Epstein-Barr (STORB, 1995).

O tratamento para a doença aguda soma o uso de corticosteróides aos cuidados de suporte, como a nutrição parenteral e profilaxia e tratamento de infecções. Além da talidomida o uso de luz ultra-violeta associada ao psoralen (PUVA), também tem sido empregado para o controle local da doença, principalmente para as manifestações de pele, (ASCHAN, 1994).

Prognóstico

Embora a gravidade da GVHD esteja correlacionada a vários fatores, entre eles, o grau de histocompatibilidade HLA, as alterações histológicas encontradas em biópsias de pele, demonstram ser um método auxiliar com alto grau de sensibilidade para se estabelecer prognóstico. GVHD Grau I ou II da classificação proposta por LERNER *et al.*, (1974), associa-se a baixa morbidade e mortalidade. GVHD Graus III e IV está vinculada morbidade e mortalidade altas (FERRARA *et al.*, 1991).

Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Fase Crônica (GVHDc)

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica, foi reconhecida a partir da década de 70, onde pacientes submetidos ao TMO sobreviveram tempo suficiente para sua manifestação

(STORB *et al.*, 1976). É reconhecida como uma síndrome de características de autoimunidade e imunodeficiência, semelhante a doenças do colágeno como a esclerodermia, Síndrome de Sjögren e cirrose biliar primária (SHULMAN *et al.*, 1980), representada por uma agressão imunológica das células enxertadas do doador contra as do receptor de medula, através do reconhecimento de diferenças nos antígenos de histocompatibilidade maior ou menor. Sua incidência varia entre 30% e 50% dos pacientes submetidos ao transplante alogênico HLA idêntico. Clinicamente envolve a pele, a boca, os olhos, o esôfago e o trato respiratório superior (ATIKINSON, 1990).

As manifestações clínicas ou laboratoriais da GVHDc aparecem em média 3-4 meses após o TMO, mas podem aparecer mais precocemente, ao redor do dia +70 pós-TMO ou mesmo após 15 meses (ATIKINSON, 1990). Pode se manifestar em continuidade à forma aguda, sem intervalo de melhora, sendo denominada de *progressiva*, ser quiescente, quando há um intervalo entre a forma aguda e a crônica da doença, ou surgir *de novo* quando não há precedência da forma aguda. Arbitariamente foi definido que +100 pós-TMO seria um ponto de distinção entre a manifestação aguda e a crônica da síndrome (ATIKINSON, 1990).

Classificação Segundo Parâmetros Clínicos

Segundo parâmetros clínicos de extensão da síndrome, a GVHD crônica foi classificada por SHULMAN *et al.*, 1980, de acordo com a tabela a seguir (Tabela 6). Pacientes com GVHDc limitada envolvendo a pele ou o fígado, possuem uma evolução mais favorável em relação à manifestação extensa (SULLIVAN, 1994)

Tabela 6. Classificação da GVHD crônica segundo SHULMAN *et al.*, 1980 - grupo de Seattle

Classificação da GVHDc segundo o grupo de Seattle	
GVHDc LIMITADA	ISOLADA OU ASSOCIADA 1 - pele 2 - disfunção hepática derivada da GVHDc
GVHDc EXTENSA	ISOLADA 1 - envolvimento generalizado da pele 2 - pele localizada e/ou disfunção hepática originada pela GVHDc ASSOCIADA 3a - histopatologia hepática demonstrando hepatite crônica agressiva, cirrose e, b - envolvimento ocular (teste de Schimmer < 5mm) c - envolvimento de glândula salivar menor, por biópsia d - envolvimento de outros órgãos alvo

SHULMAN *et al.*, 1980

Imunodeficiência na GVHD Crônica

Um dos principais fatores associados à alta mortalidade entre os pacientes que apresentam GVHD crônica é a frequência de infecções conseqüentes à grave imunodeficiência decorrente da síndrome. A recuperação imunológica pós TMO ocorre aproximadamente em 1 ano naqueles pacientes sem manifestação da GVHD crônica. Nos que apresentam a síndrome, a contagem de linfócitos T CD4⁺ circulatórios é diminuída, assim como o nível de interleucina 2. A biosíntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B também está diminuída nos pacientes com GVHD crônica, provavelmente devido à diminuição da capacidade de proliferação e diferenciação dos mesmos (MATSUE *et al.*, 1984). Em contrapartida, o número de células CD8⁺ está aumentado na GVHD crônica. Numerosos estudos em animais e em seres humanos demonstram um aumento da atividade das células supressora no GVHDc (ATKINSON, 1990).

Fatores Preditivos

CARLENS *et al.*, (1998) estudou 34 fatores considerados de risco para o desenvolvimento da GVHD crônica em 451 pacientes submetidos ao transplante de medula alogênico aparentado, HLA idêntico (334) e não aparentado (87), com mais de 3 meses pós TMO. A incidência acumulada da síndrome para 5 anos foi de 45%. Idade avançada do receptor foi o fator preditivo de maior influência. Em análise multivariada, a precedência da manifestação aguda, doadoras femininas para receptores masculinos e leucemia mielóide crônica (LMC) em comparação com outras doenças de base, foram estatisticamente significativas. Nos pacientes submetidos ao TMO HLA idêntico, com profilaxia da GVHD feita com CsA e MTX, a idade do receptor e LMC foram os fatores mais importantes. WAGNER *et al.*, (1988) em relato de estudo para GVHDc em 241 pacientes encontrou, como fatores preditivos (em análise univariada) para a síndrome, alterações clínicas ao exame bucal (biópsia bucal) e plaquetopenia. Em análise multivariada, a precedência da fase aguda (associada ao uso de corticóide) até o dia +100.

Manifestações Clínicas

Pele

Os achados mais comuns no envolvimento cutâneo da síndrome são a hiperpigmentação, muitas vezes mesclada à hipopigmentação, eritema com descamação e pápulas eritematosas ou violáceas semelhantes ao líquen-plano. Alterações tardias incluem fibrose dérmica e subcutânea causando espessamento da pele semelhante ao da esclerodermia, podendo levar à contratura articular, ulcerações, dificuldade de cicatrização e dificuldade de vascularização. Alopecia pode estar associada a infecções locais, podendo ser definitiva ou não (ATKINSON, 1990).

A doença localizada, caracteriza-se por alterações histológicas como atrofia da epiderme e fibrose dérmica densa, com total ausência de processo inflamatório importante. No tipo generalizado, pode-se observar processo inflamatório em ductos écrinos e em unidades pilosas

resultando em fibrose dérmica em torno de estruturas anexiais. A doença pode ser desencadeada pela exposição ao sol, ou se desenvolver em áreas de traumas ou esforços (SHULMAN & SALE, 1984).

Características Histológicas

SHULMAN, (1984) descreveu os achados histológicos em biópsias de pele que são semelhantes aos encontrados no líquen-plano pigmentado, caracterizado por hiperkeratose lamelar, hipergranulose e camada basal parcialmente obscurecida por uma reação liquenóide difusa. O infiltrado na camada basal é composto basicamente por linfócitos e alguns monócitos. Esse infiltrado é mais intenso que na forma aguda da síndrome e menos do que o encontrado no líquen-plano. Células epiteliais necróticas, conhecidas como corpos de Civatte, não são patognomônicas da síndrome, mas altamente sugestivas da doença quando nesse contexto. (ATKINSON, 1990). Espongiose intensa e degeneração hidrópica da camada basal pode produzir verdadeiras fendas separando a epiderme da derme. Incontinência pigmentar livre na em derme papilar ou dentro de macrófagos também pode ser encontrada (Figuras 7 e 8). Manifestações precoces da GVHD crônica são distinguíveis da forma aguda ou do líquen-plano devido às alterações inflamatórias ao redor dos anexos epiteliais. Alterações tardias estão relacionadas a processos de esclerose progressiva da derme profunda (SHULMAN *et al.*, 1984).

Estudos imunológicos demonstram que os linfócitos CD8⁺ predominam no infiltrado mononuclear (LAMPERT *et al.*, 1982). Na junção dermoepidérmica, em proximidade ao local de maior agressão, há deposição de IgM e complemento (TSOI *et al.*, 1978). Critérios adicionais, baseados em biópsias consecutivas, incluem a homogeneização e reorganização do colágeno presente na derme reticular e na junção dermoepidérmica, reação inflamatória nos glomérulos sudoríparos écrinos e, ocasionalmente, paniculite profunda. Por não ser a doença uniforme, tanto

na distribuição como no acometimento, os locais a serem escolhidos para biópsia devem conter áreas de hiper e de hipopigmentação. Muitas vezes, nas biópsias obtidas de pacientes que ainda estão em tratamento imunossupressor ou mesmo daqueles que o interromperam recentemente, as alterações inflamatórias são mínimas ou totalmente ausentes. Nesses casos, a presença de degeneração da camada basal ou apoptose na epiderme e seus apêndices, e nas glândulas salivares ou mesmo nos ductos biliares, sugerem atividade da doença.

Diferenças entre as formas limitada e extensa da GVHDc na pele dependem do local onde se inicia a fibrose, se profundamente (forma localizada), ou na região subepitelial (forma extensa). Portanto, é importante, além do local de coleta da biópsia, que esta seja de bom tamanho e profundidade, incluindo a tela subcutânea (SHULMAN *et al.*, 1984).

Caracterização Histopatológica da Pele na GVHD Crônica

A determinação dos critérios diagnósticos histopatológicos para a GVHD crônica em pele é realizado de acordo com os descritos por SHULMAN *et al.*, (1984) (Tabela 7), associados à graduação descrita por LERNER *et al.*, (1974).

Tabela 7. Critérios Histológicos para GVHD crônica de pele

Critérios Histológicos para GVHD crônica de pele	
Negativo	Sem alterações histológicas
Positivo	Hiperceratose e hipergranulose, acantose, reação liquenóide epidérmica ou anexial, presença de ceratinócitos necróticos com satelitose linfocitária, incontinência pigmentar, melanófagos na derme subjacente e metaplasia escamosa ductal.

SHULMAN HM *et al.*, 1984

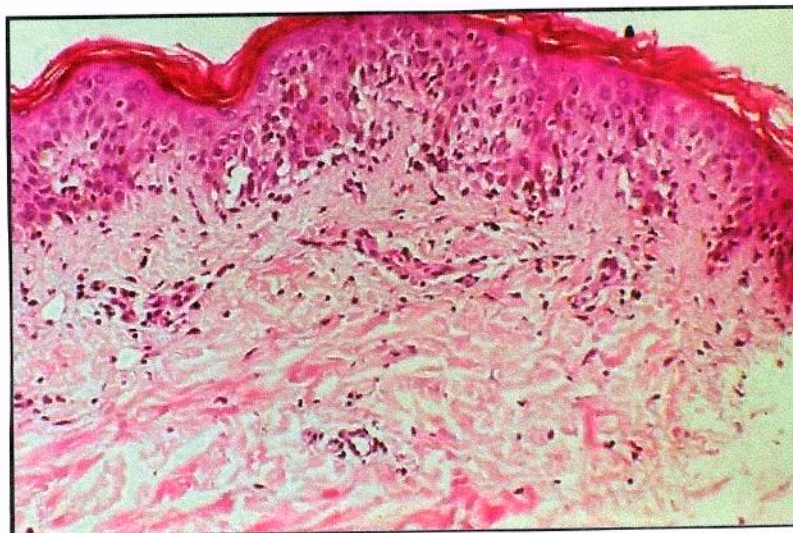


Figura 7. Corte de pele com sinais morfológicos da GVHD grau II (positivo para GVHD). Observa-se extensa degeneração hidrópica da camada basal da epiderme, moderado infiltrado inflamatório linfocitário predominantemente ao nível da junção dermoepidérmica e necrose de ceratinócitos isolados (H&E, aumento original x 200)

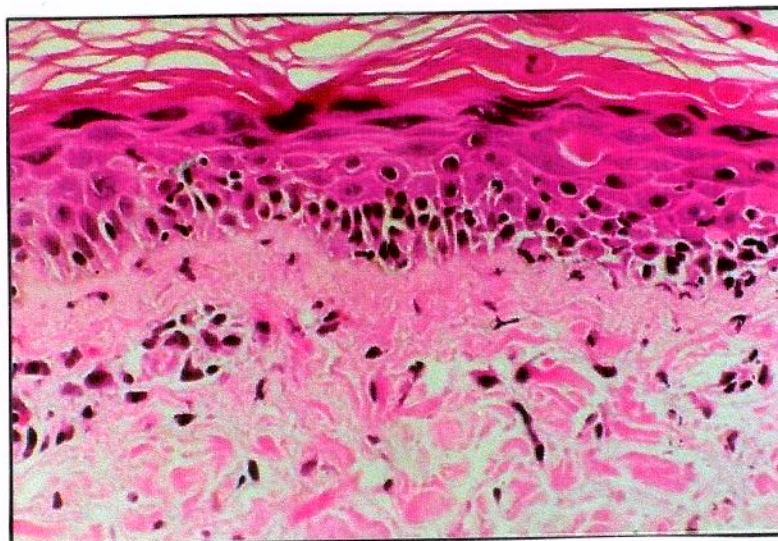


Figura 8. Corte de pele com sinais morfológicos da GVHD crônica liquenóide. Observa-se hiperkeratose, hipergranulose, infiltrado inflamatório linfóide localizado ao nível da junção dermoepidérmica, sendo muitas vezes os linfócitos satélites a ceratinócitos necróticos (H&E, aumento original x 125)

Boca

Eritema e atrofia em mucosa bucal, disfagia e perda do paladar, associadas a lesões liquenóides e xerostomia são as características clínicas mais freqüentes na cavidade bucal (SALE 1994) (Figuras 9 – 16). As lesões liquenóides são caracterizadas clinicamente por pápulas filiformes radiadas, brancas ou acizentadas, aveludadas, dispostas de modo linear, anular ou reticular, formando áreas circunscritas, anéis e estrias rendilhadas na mucosa. A forma erosiva do liquem-plano também está associada à apresentação clínica da GVHDc bucal. São encontradas úlceras de tamanhos e formas irregulares e aparecem como áreas cruentas, doloridas, justapostas a áreas de atrofia. Essas regiões se apresentam avermelhadas, lisas, muitas vezes mal definidas sem superposição com as estrias (HORN *et al.*, 1997). Alterações em parótida (dor e aumento de volume) também podem ser encontradas segundo NAKAMURA *et al.*, (1996).



Figura 9. GVHD crônica liquenóide em lábio. Notar a xerodermia peri-labial, além de queilite angular à esquerda



Figura 10. GVHD crônica liquenóide em lábio. Mesma paciente da foto anterior, mostrando ulcerações associadas à lesão liquenóide, local da realização da biópsia, queilite angula à esquerda, aumento de volume da gengiva interdentária



Figura 11. GVHD crônica liquenóide em palato duro



Figura 12. GVHD crônica liquenóide em boca. Notar estrias esbranquiçadas em toda mucosa labial e gengival



Figura 13. GVHD crônica liquenóide em boca. Lesões liquenóides ulceradas em mucosa jugal



Figura 14. GVHD crônica liquenóide em boca. Lesão liquenóide ulcerada em mucosa jugal

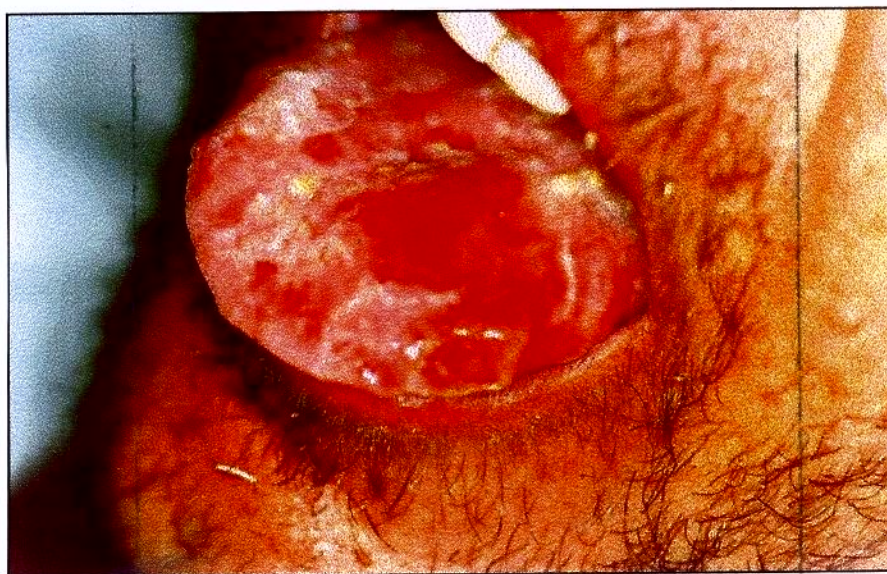


Figura 15. GVHD crônica liquenóide atrófica em boca. Lesões ulceradas em mucosa lingual (dorso e borda lingual)



Figura 16. GVHD crônica liquenóide. Lesões ulceradas em lábio superior, lesões esbranquiçadas em palato duro. A proteção ocular é decorrente da xeroftalmia acentuada

A biópsia de mucosa bucal é extensamente usada por vários autores no diagnóstico da Síndrome de Sjögren (SS). Sua aplicação no diagnóstico da GVHD crônica foi feita primeiramente por GRATWOHL *et al.*, (1977) e LAWLEY *et al.*, (1977) em 4 pacientes com GVHDc que apresentaram síndrome *sicca* e infiltrado inflamatório crônico em biópsia de lábio e glândula salivar menor. Diferentemente da Síndrome de Sjögren, os pacientes com GVHD crônica não apresentam a tríade característica da doença. HIROKI *et al.* (1996) em estudo histológico comparativo entre pacientes com Síndrome de Sjögren (SS) e outros com GVHD, demonstrou a predominância de linfócitos CD8+ sobre os CD4+ em amostras de pacientes com GVHDc, diferentemente do que ocorre naqueles com SS. Células epiteliais ductais associadas

com infiltração linfocitária expressaram antígenos HLA-DR nos casos de GVHDc, enquanto que naqueles com SS a expressão do antígenos não necessariamente se associava à presença do infiltrado linfocitário.

Classificação Histopatológica da GVHD Crônica na Boca

Há várias classificações histopatológicas propostas para a GVHDc na boca. SALE, (1994) subdividiu o processo em graus I e II, segundo a intensidade da reação inflamatória, sendo que os corpos apoptóticos estariam presentes apenas no grau II. A especificidade diagnóstica para GVHDc nos graus foi, respectivamente de 50% (grau I) e 75% (grau II). HORN, 1995, propôs uma classificação para as alterações histológicas encontradas na mucosa oral e glândulas salivares menores, sumariadas na tabela 9. As Figuras 17 – 32 demonstram a interpretação comparativa à classificação de HORN utilizada nesse trabalho, em mucosa bucal e glândula salivar menor.

Tabela 9. Critérios histológicos para diagnóstico da GVHD crônica em mucosa oral e glândula salivar menor segundo HORN, 1995

GRAU	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
1	Mucosa: vacuolização das células basais, moderado infiltrado linfocitário; moderada exocitose epitelial. Glândula Salivar: moderado infiltrado intersticial.
2	Mucosa: vacuolização basal, células epiteliais disceratóticas, necrose de ceratinócitos com satelitose, moderado a intenso infiltrado linfocitário na submucosa e moderada exocitose epitelial Glândula Salivar: moderada destruição acinar, dilatação ductal, metaplasia escamosa, acúmulo de muco, fibrose moderada, proliferação de células ductais e infiltrado linfocitário periductal
3	Mucosa: clivagem focal entre o epitélio e o cório, intenso infiltrado linfocitário no cório, células epiteliais disceratóticas, exocitose linfocitária. Glândula Salivar: marcado infiltrado linfocitário intersticial, destruição difusa de ductos e ácinos.
4	Mucosa: separação entre o epitélio e o cório Glândula Salivar: completa perda dos ácinos, ductos marcadamente dilatados e fibrose intersticial com ou sem infiltrado

Critérios histológicos segundo HORN TD, 1995

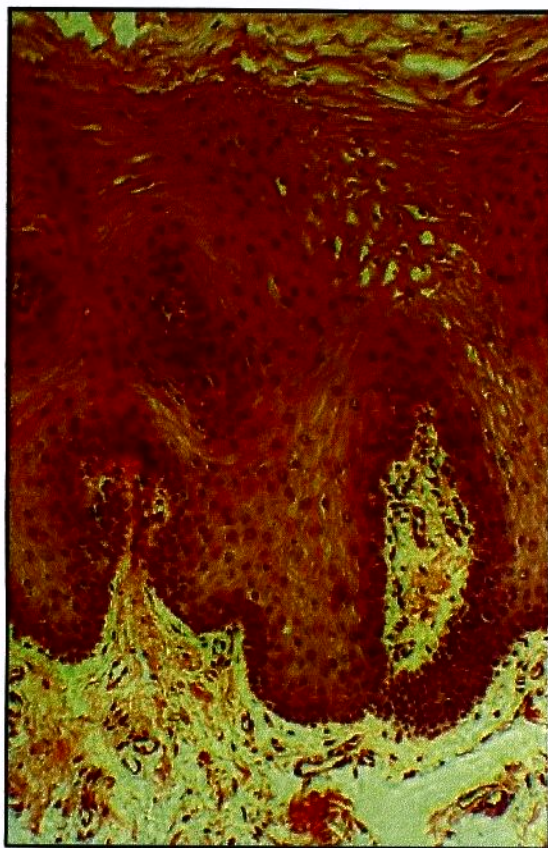


Figura 17. Corte de mucosa labial sem alterações em paciente tratado com o transplante de medula óssea (H&E, aumento original x 125)

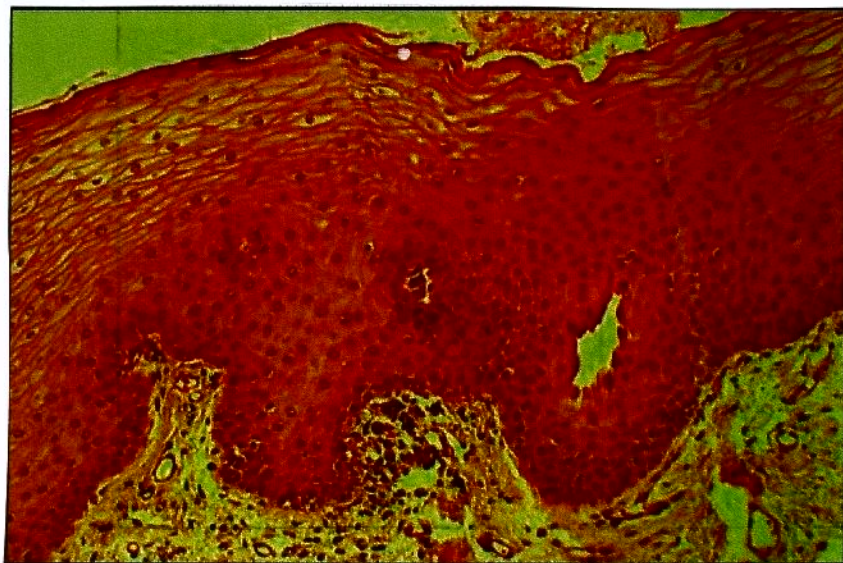


Figura 18. Corte de mucosa labial com sinais morfológicos da GVHD crônica Grau I de Horn. Leve infiltrado linfocitário com exocitose basal focal, associada a discreta vacuolização da camada basal do epitélio (H&E, aumento original x 125)

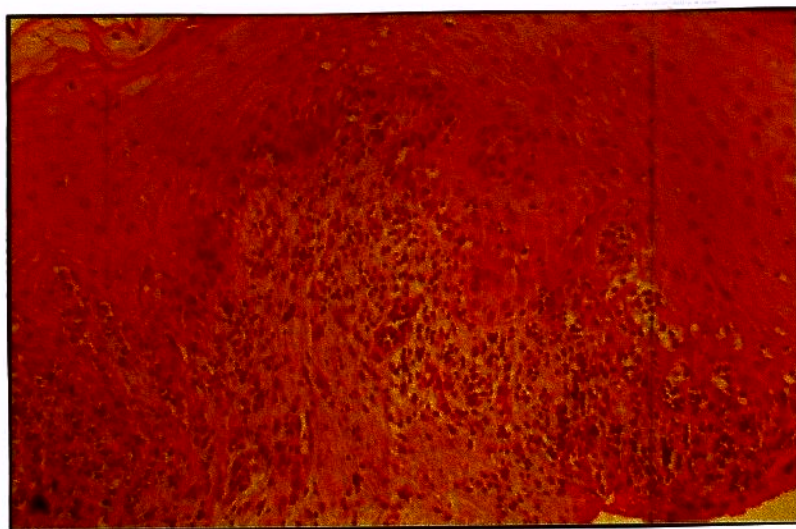


Figura 19. Corte de mucosa labial com sinais morfológicos da GVHD crônica liquenóide Grau II de Horn. Observa-se metaplasia cornificada (ver canto superior direito) com grânulos cerato-hialinos na superfície do epitélio, vacuolização da camada basal, necrose de ceratinócitos isolados e infiltrado linfocitário moderado em faixa ao nível da junção entre o epitélio e o cório, com exocitose moderada para o epitélio (H&E, aumento original x 125)

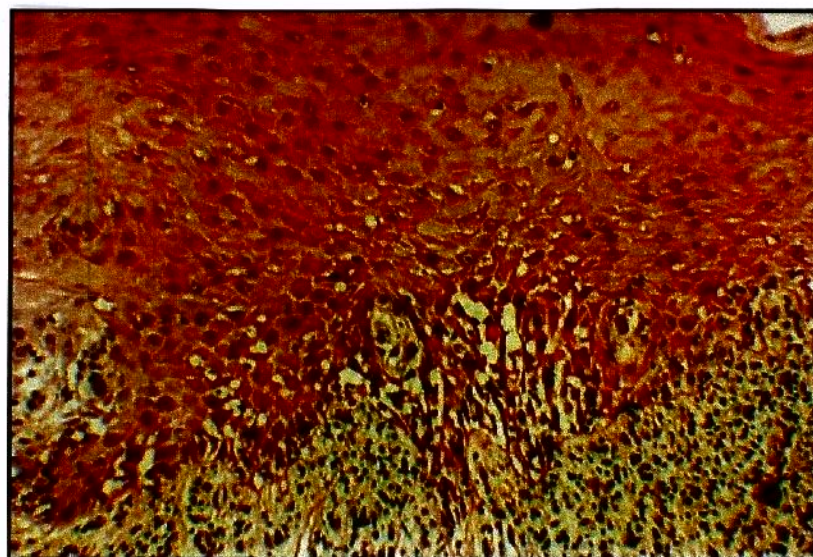


Figura 20. Corte de mucosa labial com sinais morfológicos da GVHD crônica liquenóide Grau II de Horn. Em relação à figura anterior nota-se degeneração hidrópica basal mais acentuada, assim como maior número de ceratinócitos necróticos, esboçando-se fenda subepidérmica (H&E, aumento original x 200)

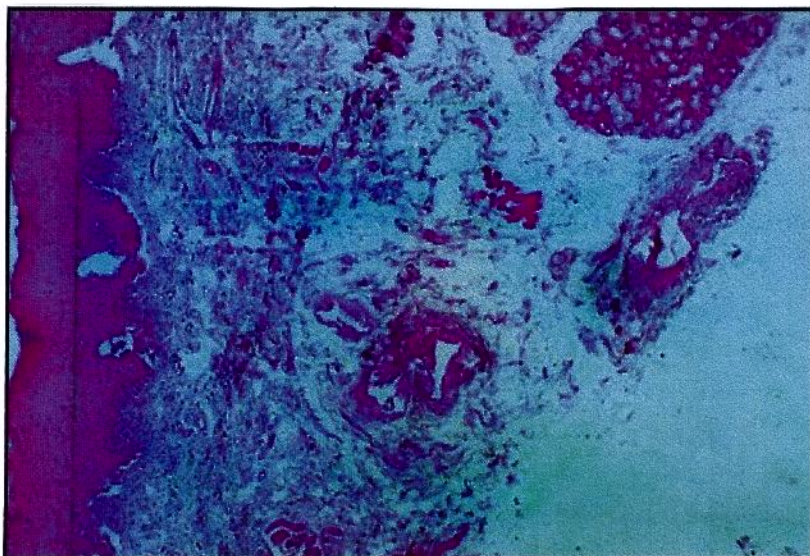


Figura 21. Corte de mucosa labial com sinais morfológicos da GVHD crônica liquenóide Grau III de Horn. Observam-se vários focos de separação entre o epitélio e o cório e faixa de infiltrado linfocitário subepitelial. No canto inferior direito, presença de alguns lóbulos de glândulas salivares acessórias, sem particularidades (H&E, aumento original x 50)

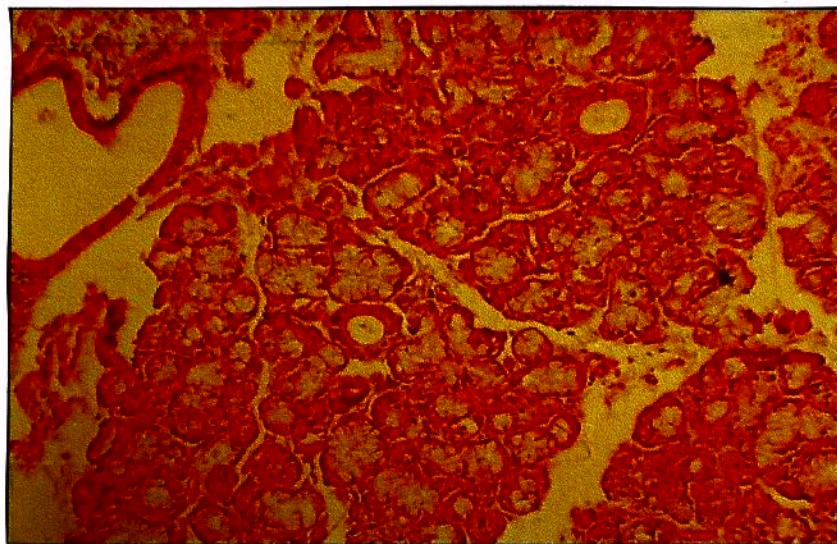


Figura 22. Corte de glândula salivar acessória sem alterações em paciente tratado com o transplante de medula óssea (H&E, aumento original x 200)

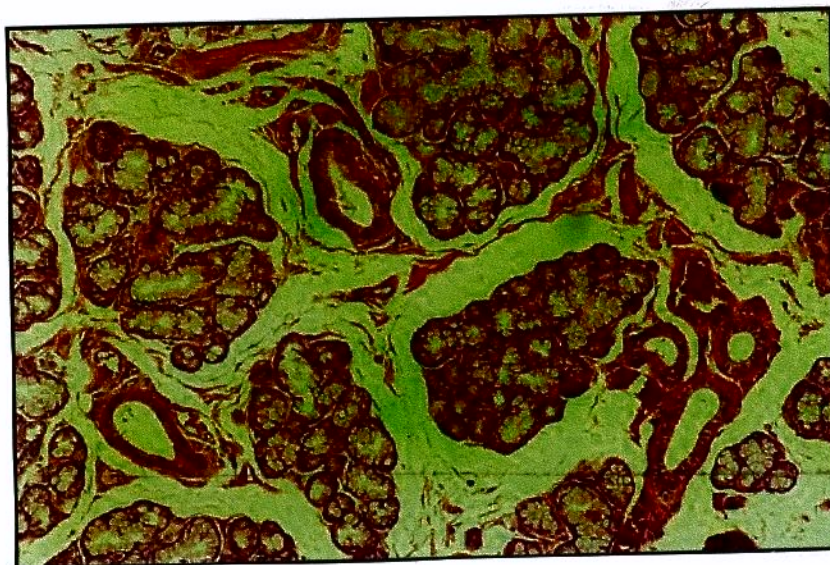


Figura 23. Corte de glândula salivar acessória sem alterações em paciente tratado com o transplante de medula óssea (H&E, aumento original x 200)

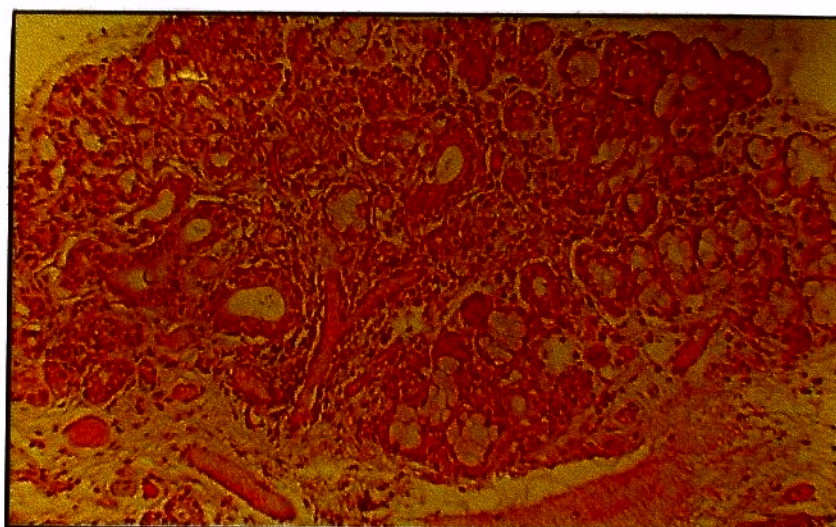


Figura 24. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD Grau I de Horn. Observa-se discreto infiltrado linfo-plasmocitário intersticial (H&E, aumento original x 200)

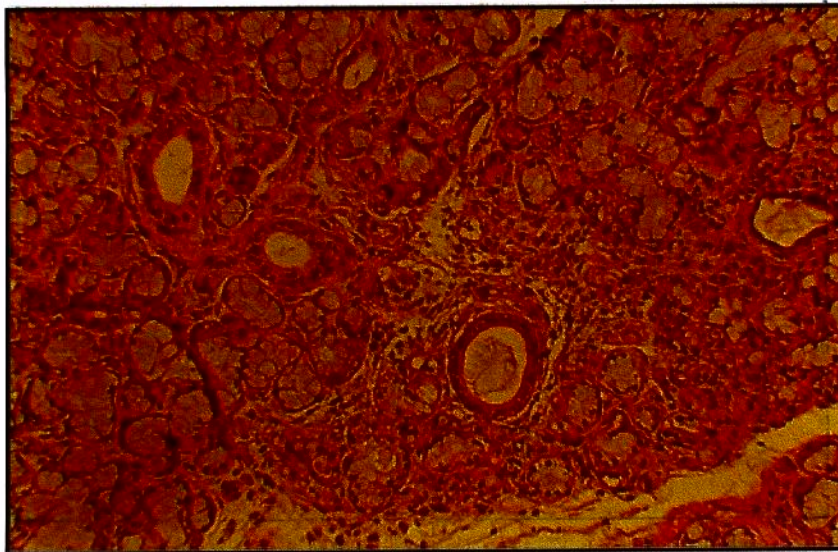


Figura 25. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos de GVHD crônica Grau II de Horn. Nota-se discreta redução do componente acinar, leve dilatação ductal (direita), acúmulo de muco no lume ductal, escassa fibrose intersticial e infiltrado linfo-plasmocitário leve (H&E, aumento original x 125)

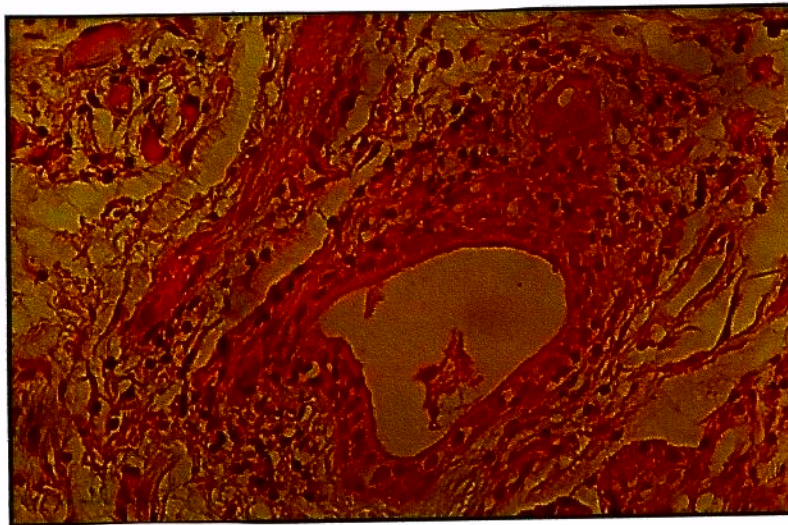


Figura 26. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos de GVHD crônica Grau II de Horn. Observa-se, em aumento maior que o da figura anterior, infiltrado linfo-plasmocitário permeando o epitélio ductal. Alguns dos núcleos do epitélio ductal ainda exibem sinais do condicionamento, caracterizados por atipia e perda de polaridade (H&E, aumento original x 312)

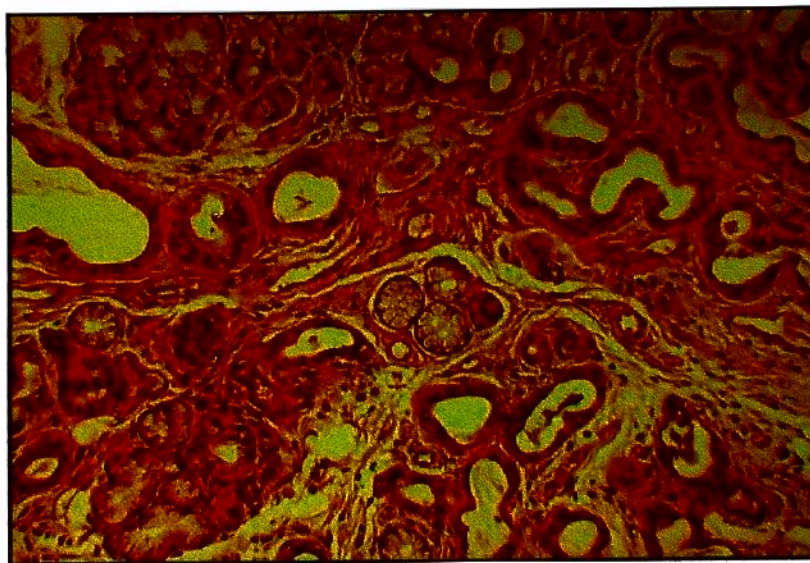


Figura 27. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD crônica Grau III de Horn. Observa-se infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário difuso, com destruição acinar multifocal moderada, ductos dilatados, com epitélio atrófico, acúmulo de muco no lume dos ductos e fibrose mais extensa que no Grau II (H&E, aumento original x 100)

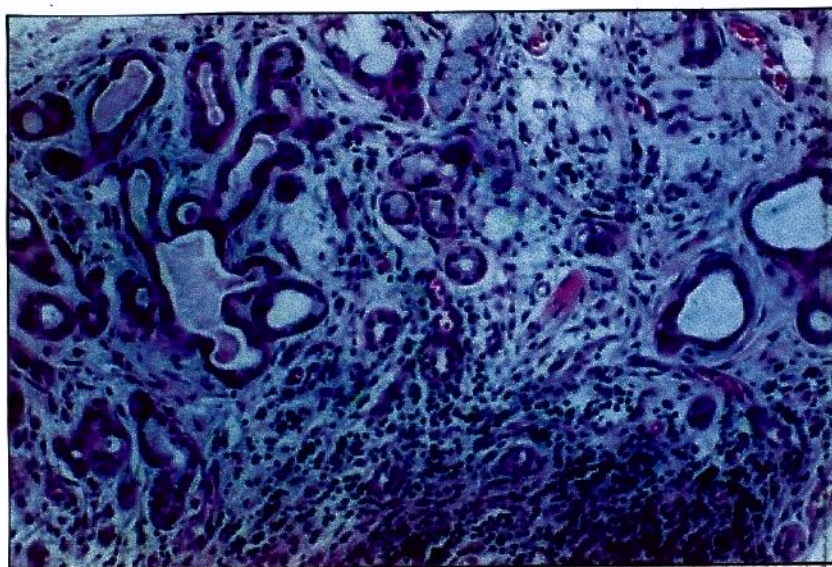


Figura 28. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD crônica Grau IV de Horn. Observa-se intensa perda acinar, dilatação e proliferação ductal, com acúmulo de muco no lume e fibrose intersticial, sendo o infiltrado linfocitário escasso (H&E, aumento original x 200)

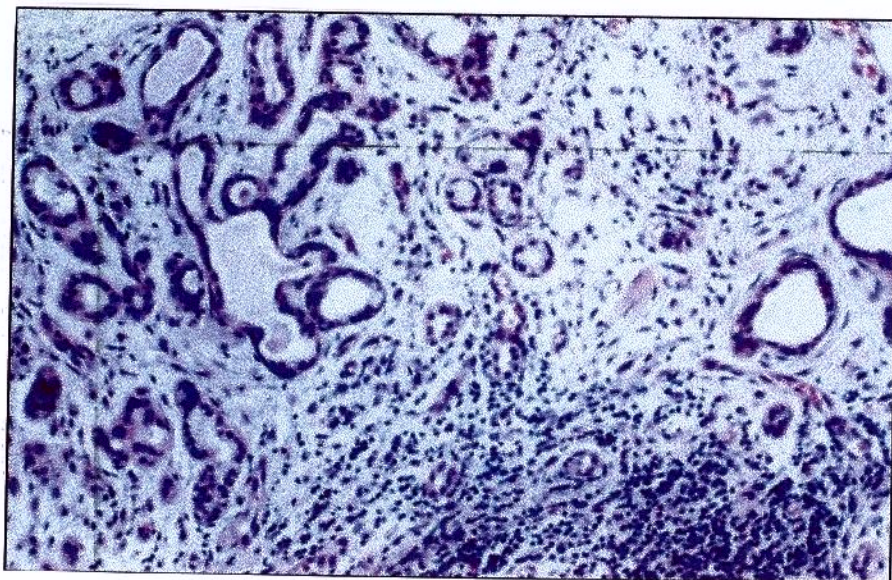


Figura 29. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD crônica Grau IV de Horn. Observa-se marcada perda acinar, fibrose, infiltrado linfóide moderado e ectasia ductal. No centro, hiperplasia e metaplasia escamosa do epitélio ductal (H&E, aumento original x 200)

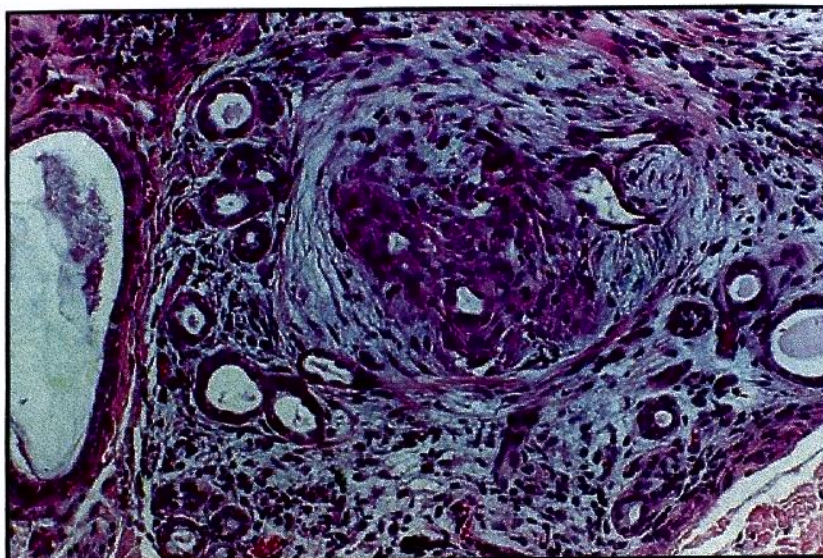


Figura 30. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD crônica Grau IV de Horn. Presença de acentuada perda acinar, ectasia e proliferação ductal com acúmulo de muco no lume, fibrose e infiltrado linfo-plasmocitário intersticial (H&E, aumento original x 200)

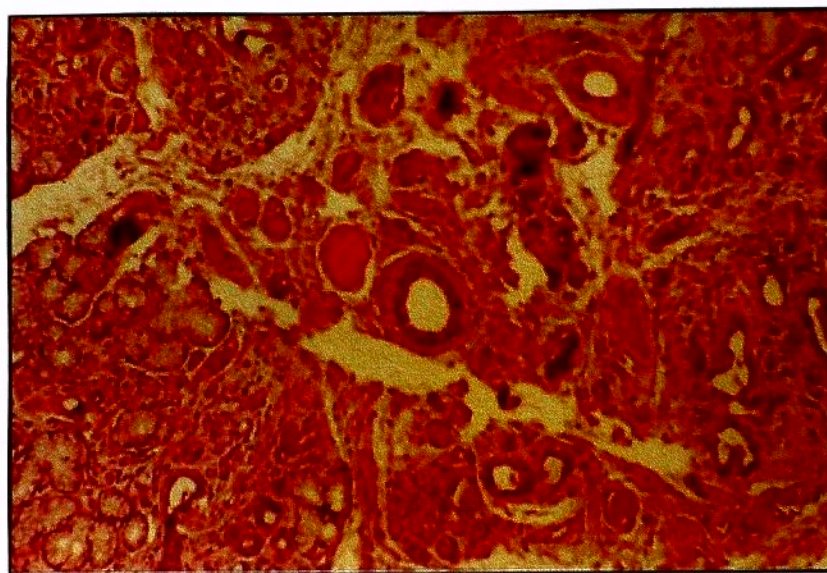


Figura 31. Corte de glândula salivar acessória com sinais morfológicos da GVHD crônica. Observa-se que o acometimento não é uniforme dentro da mesma glândula. À direita nota-se leve destruição acinar, com grau discreto de dilatação ductal, fibrose e infiltrado linfo-plasmocitário (Grau II de Horn). À esquerda observa-se destruição acinar mais proeminente, quase completa, dilatação ductal e fibrose mais acentuada (Grau IV de Horn) (H&E, aumento original x 200)

Outros Órgãos

A manifestação mais comum nos **olhos** é a cerato-conjuntivite seca, com xeroftalmia, dor e desconforto intenso (FRANKLIN *et al.*, 1983). A xeroftalmia e a xerostomia são características da Síndrome de Sjögren-símile. De fato, a falta de lubrificação pode se estender à mucosa do trato respiratório superior e inferior, constituindo a síndrome sino-pulmonar seca. O teste de Schimmer é utilizado para caracterizar a xeroftalmia (ATIKINSON, 1990). A síndrome *sicca*

também pode afetar a mucosa vaginal, associando-se a inflamação, estenose e descamação (CORSON *et al.*, 1982).

No **fígado**, a hepatite obstrutiva, refletindo anormalidades ductais, é demonstrada em observações histopatológicas (SNOVER *et al.*, 1984) e, clinicamente, através de alterações laboratoriais específicas (alterações ALT, AST, etc). Muito raramente, a doença hepática progride para cirrose e/ou falência hepática (YAU *et al.*, 1986).

Ao contrário da forma aguda, o envolvimento **intestinal** na GVHDc é raro, mas, se presente, pode causar diarreia e dor abdominal, assim como má absorção (BESCHORNER *et al.*, 1981).

O envolvimento **pulmonar** é caracterizado por bronquiolite obstrutiva, dispnéia, pneumotórax e disfunção respiratória (ROCA *et al.*, 1982) ou pneumonia intersticial (PERREAULT *et al.*, 1985) e fibrose pulmonar (JANIN *et al.*, 1985), podendo ser fatal.

As alterações mais comuns encontradas no **sistema hematopoético** são eosinofilia e trombocitopenia (FIRST *et al.*, 1985), que no conjunto, resultam num pior prognóstico de sobrevida (ANASETTI *et al.*, 1989).

Tratamento

Tratamento para a Doença Estabelecida

Com o aumento da morbidade da GVHDc face à crescente sobrevida dos transplantados, as medicações imunossupressoras têm sido instituídas mais precocemente e por um período maior de tempo. Prednisona, azatioprina, ciclosporina e ciclofosfamida, isoladamente ou em combinações, têm sido empregadas como terapia de escolha para a doença (ATKINSON, 1990). Psoralen juntamente com raios ultravioleta A (PUVA) é utilizado em diversos centros de transplante, como terapia para GVHDc da boca e pele, permitindo a diminuição das doses de corticóide

(ATKINSON *et al.*, 1986). O uso da talidomida tem demonstrado excelente resultado na GVHDc muco-cutânea (ROVELLI *et al.*, 1998). Ciclosporina em bioadesivo bucal, também tem sido utilizada para as lesões liquenóides orais, em associação ao tratamento imunossupressor sistêmico (EPSTEIN *et al.*, 1996).

Avaliação do Dia +100

Estabelecida pelo grupo de Seattle e, posteriormente, incorporada como protocolo para os demais serviços de TMO, a primeira avaliação para diagnóstico da GVHDc é realizada ao redor do dia + 100 pós TMO. Inclui biópsia de pele, mucosa oral e glândula salivar acessória e teste de Schimmer, entre outros exames clínicos e laboratoriais, como biópsia de medula óssea, testes para avaliação hepática e imunológica, teste de função pulmonar e avaliação nutricional. O estabelecimento precoce do tratamento para a GVHD crônica está correlacionado com uma maior sobrevida (SALE, 1994).

Complicações Tardias

Transplante alogênico de medula óssea tem sido utilizado de maneira crescente no tratamento de diversas doenças hematológicas e imunodeficiências. Mais de 35000 pessoas receberam transplante de medula óssea entre 1970 e 1990, segundo dados do Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (*IBMTR – International Bone Marrow Transplant Registry*) indicando que entre 30% e 65% dos pacientes que receberam transplantes HLA- idênticos estão livre de doença num período de 5 anos, dependendo da doença de base e de seu estágio. Dados ainda do *IBMTR* sugerem que 50% de todas as mortes ocorrem num período precoce (3 meses) pós TMO e 70% deles nos primeiros 6 meses. Entretanto, os pacientes ainda podem sofrer efeitos tardios do TMO, como GVHD, recaídas de leucemia e neoplasias secundárias (DICKE, 1994).

Recaídas de leucemia podem ocorrer nos primeiros 2 anos pós TMO, mas dados ainda do IBMTR relatam casos de recaídas mesmo depois de 8 anos pós TMO. Nos pacientes que sobrevivem 2 anos em remissão, a probabilidade de recaída nos 3 anos subseqüentes é de 8+/- 1%. Outras neoplasias podem ocorrer, incluindo tumores sólidos, linfomas e carcinomas, como por exemplo o carcinoma escamoso de gengiva (OTSUBO *et al.*, 1997), podendo ser resultantes de fatores genéticos, de tratamentos anteriores para a doença primária, altas doses de quimio e/ou radioterapia e imunossupressão prolongada pós transplante (DICKE, 1994). REITER *et al.*, (1997) em estudo com 20 pacientes transplantados para anemia aplástica grave, relatou o aparecimento de uma segunda neoplasia em um dos pacientes 11 anos após o TMO. Desses 20 pacientes estudados, 8 desenvolveram GVHD crônica e 18 mantêm condições hematológicas reconstituídas depois de 9 anos de observação (índice de Karnofsky 90%).

A sinusite é um dos achados mais freqüentes encontrados nos pacientes submetidos ao TMO, como infecção decorrente da GVHDc associada à síndrome *sicca*, pela predisposição às infecções por bactérias gram-positivas.

NORHAGEN *et al.*, (1994), estudou imunoglobulinas salivares em pacientes submetidos ao TMO. O autor encontrou níveis aumentados de IgG salivar em pacientes com infecção por CMV, mas diminuição do nível de IgG e IgA naqueles com GVHDc, mesmo após 1 ano do TMO. As alterações dos níveis de imunoglobulinas, segundo o autor, não estão correlacionadas com o tipo de regime de condicionamento utilizado. Em pacientes livres de GVHDc a recuperação dos níveis normais de IgM se dá em torno de 6 meses e de IgG em até 1 ano pós-TMO, enquanto que a normalização dos níveis de IgA se dá tardiamente, em até 4 anos pós-TMO.

MARKS *et al.*, (1993), relatou alterações de fluxo salivar decorrentes do regime de condicionamento, que permaneceram por longos períodos pós-TMO principalmente em relação àqueles que foram submetidos a condicionamento com radioterapia corpórea total, onde o fluxo

salivar da parótida foi reduzido em até 96% em relação ao normal. CHAUSU *et al.*, (1993) correlaciona esse achado com danos acinares (fibrose) e endoteliais irreversíveis. Em pacientes livres de GVHDc, pode haver redução de 40% do fluxo salivar total em 2 anos, decorrente ainda do regime de condicionamento. Em pacientes com GVHDc, a redução do fluxo salivar pode chegar a 55%.

A incidência de microorganismos cariogênicos em pacientes submetidos ao TMO foi estudado por DENS *et al.* (1996). O autor encontrou um pequeno aumento na UFC de *Streptococcus mutans* no período pós-TMO imediato e uma diminuição estatisticamente significativa do número de *Lactobacillus*, comparativamente aos valores no período pré-TMO (10^5 UFC/ml para *Streptococcus mutans* e 10^3 UFC/ml para *Lactobacillus*). O autor correlaciona esse achado com as medidas locais de controle bacteriano utilizadas tais como bochecho com clorexedine e fluoreto de sódio, além da higiene bucal mecânica e uso de antibióticos. Entretanto, esse achado, segundo o autor, representa um número superior ao esperado em pacientes não submetidos a qualquer tipo de terapia citotóxica. Em contrapartida, quando a capacidade do tampão salivar foi estudada por este autor, ela se mostrou extremamente diminuída (mediana de pH ao redor de 4) mesmo após 10 semanas do TMO. Esses achados são discutidos por CURTIS *et al.*, (1994), ao descrever um aumento do número de cáries cervicais em pacientes com GVHDc como consequência tardia das complicações bucais do TMO.

A leucoplasia pilosa foi inicialmente descrita na década de 80, como uma lesão associada a pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Está vinculada à presença do vírus Epstein-Barr (EBV) e encontrada em epitélio paraceratinizado da mucosa bucal, principalmente em borda lateral da língua. Essa lesão possui características histológicas específicas, como paraceratose e acantose além da papilomatose de dentes em serra e balonização celular com inclusão viral dos ceratinócitos e com infiltrado inflamatório esparsos no tecido

conectivo (ITIN, 1993). GREEN *et al.*, (1989) chamou de pseudo-leucoplasia pilosa as lesões que mimetizavam a leucoplasia pilosa à clínica e à histologia mas nas quais não foi possível a detecção do vírus Epstein-Barr (ITIN, 1993). Essas lesões foram descritas por diversos autores, correlacionando um estado de imunossupressão grave, como nos transplantados renais, nos de medula óssea (associado ou não à presença da GVHDc), assim como também naqueles com idade avançada, mesmo sem imunossupressão medicamentosa (GREESPAN *et al.*, 1988; EPSTEIN *et al.*, 1993; KING *et al.*, 1994)



Figura 32. Cáries cervicais em todos os dentes em paciente transplantado de medula, que apresentou GVHD crônico extenso, em controle após 4 anos de TMO

Justificativa do Trabalho

São vários os trabalhos na literatura que ressaltam a importância do trabalho conjunto entre o cirurgião dentista e a equipe de TMO, visando o diagnóstico e controle das doenças bucais relacionadas ao TMO (CURTIS *et al.*, 1994; NAKAMURA *et al.*, 1996; DENS *et al.*, 1996). A avaliação odontológica sistemática dos pacientes a serem submetidos ao TMO no período pré TMO e, posteriormente, nos períodos trans e pós TMO gerou esse trabalho que visava o conhecimento mais pormenorizadamente das manifestações bucais associadas ao TMO em nossa população, especialmente quanto a:

- Qual o valor de se acompanhar estes pacientes na detecção precoce das complicações bucais e na sobrevida?
- Qual o valor das biópsias protocolares, coletadas mesmo na ausência de manifestações aparentes de doença?
- Qual a repercussão, no prognóstico, do acometimento bucal na GVHDc isoladamente e relativamente aos outros órgãos?
- Além dos aspectos acima, coletar outras informações clínicas relevantes para estudo comparativo posterior com a sobrevida



Objetivos

Estudar, prospectivamente os aspectos clínicos e histopatológicos dos primeiros pacientes selecionados para TMO nos 20 meses subseqüentes ao seu início, com ênfase particular à mucosa oral e glândulas salivares acessórias no dia + 100 e no momento do diagnóstico clínico da GVHD crônica feita posteriormente ao dia +100 pós TMO, com o objetivo de:

1. Avaliar a especificidade e sensibilidade da análise histopatológica que é feita de forma protocolar no dia +100 pós TMO;
2. Estudar a freqüência comparativa de acometimento da pele, mucosa bucal e glândula salivar na GVHD crônica;
3. Determinar os parâmetros clínicos associados à sobrevida pós transplante;
4. Determinar os parâmetros clínicos preditivos de GVHD crônica;
5. Determinar o valor da análise da mucosa bucal e glândula salivar acessória na sobrevida pós transplante de medula óssea.

Pacientes e Métodos

Crêterios de Inclusão e Exclusão

Participaram do estudo todos os pacientes tratados pelo TMO no serviço de Transplante de Medula óssea do HEMOCENTRO/HC - UNICAMP, no período de setembro de 1993 a maio de 1995 que puderam ser avaliados aos 100 dias pós transplante. Do total de 63 transplantes realizados durante esse período, apenas 45 pacientes participaram do estudo. Foram excluídos todos os que foram a óbito anteriormente a esse período e aqueles que apresentaram recaída da doença e necessitaram de novo transplante. Todos os pacientes estudados receberam enxertos HLA-idênticos e aparentados, ABO compatíveis, sendo que 32 receberam enxertos coletados por aspiração (MO) e 13 receberam células progenitoras periféricas (CPP). Os regimes de condicionamento e profilaxia da GVHD crônica obedeceram os protocolos do nosso serviço, conforme descrito anteriormente. Vinte e cinco destes pacientes foram estudados posteriormente ao dia +100 numa mediana de 195 dias (47-125) por apresentarem características clínicas ou laboratoriais, sugestivas da presença da GVHDc.

Avaliação do Dia +100

As biópsias do dia +100 na pele e na mucosa bucal, foram realizadas sob anestesia local infiltrativa, com "punch" n  3 para a pele e n  4 para a boca. Protocolarmente, a região escapular ou do dorso do braço foi sempre a escolhida para as biópsias de pele, com exceção na presença de lesão sugestiva da GVHDc em outra região.

Na mucosa bucal foi padronizada a região posterior do lábio inferior, lado esquerdo do paciente, a 1 cm do freio labial e a 1 cm do f rnice vestibular, salvo na presença de lesão sugestiva da síndrome em outra região bucal.

O material obtido das biópsias foi fixado em formol tamponado a 10% e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, para

processamento de rotina e coloração pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Colorações especiais foram indicadas quando justificadas.

Avaliação Posterior ao Dia +100

Vinte e cinco (25/45) pacientes foram rebiopsiados (pele e/ou mucosa oral) segundo critérios clínicos indicativos da presença da doença do enxerto contra o hospedeiro, a saber:

1. lesões liquenóides em pele associadas ou não à xerodermia;
2. lesões orais associadas ou não à xerostomia;
3. alterações laboratoriais, principalmente hepáticas, que sugerissem GVHDc.

Crítérios de Avaliação das Biópsias Realizadas

Todos os espécimes foram avaliados por 2 examinadoras (MEPC e MLC) de forma isolada e conjunta posterior para conferência. Em casos de divergências, os resultados foram revistos por mais de uma vez até que se houvesse um consenso entre as examinadoras. Quando diferentes graus de acometimento pela GVHDc, num mesmo espécime foram encontrados, foi feita a opção pelo grau maior, desde que fosse significativo na extensão do todo e não apenas do focal. A identificação das lâminas foi vedada para que não houvesse qualquer influência no exame. Apesar de não ter sido estudada a reprodutibilidade inter-observador da classificação de HORN poucas espécimes suscitaram divergências. Além disso, esta classificação se mostrou útil quando na separação entre o acometimento em mucosa daquele encontrado na glândula salivar. A classificação dos achados histológicos em pele foram subdivididos em dois grupos: negativo para GVHD (correspondendo aos graus 0 – sem alterações – e grau I – com alterações leves mas não permitindo o diagnóstico de certeza da GVHD) e positivo (graus II, III e IV – idênticos aos da fase aguda (LERNER) ou infiltrado liquenóide mais típico da fase crônica)

Exame Clínico da Cavidade Bucal

Exame Odontológico

Todos os pacientes foram submetidos ao exame odontológico nos dois períodos avaliatórios, nas dependências do consultório odontológico do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp. Utilizaram-se instrumentais básicos de exame clínico (espelho bucal e afastadores de madeira) e luz artificial.

Os critérios empregados para a identificação de xerostomia clínica, foram:

Critérios objetivos:

1. Ausência do lago salivar sublingual;
2. Espessamento salivar;
3. Aderência da espátula de madeira à mucosa jugal;

Critérios subjetivos:

1. Sensação de “boca seca”
2. Aumento da necessidade hídrica
3. Necessidade de lubrificação oral;
4. Dificuldade de ingestão de alimentos mais secos e necessidade de líquidos às refeições.

Critérios para a Classificação da GVHDc

Foram utilizados ainda, como parâmetros clínicos avaliatórios, a classificação de extensão da GVHDc preconizada pelo grupo de Seattle conforme anteriormente descrito à pág.

Fatores Comparativos na Análise dos Fatores Preditivos para GVHD crônica

A mediana do nível sérico de ciclosporina foi obtida a partir dos cálculos realizados desde o início da administração da droga até o dia da avaliação (quer da primeira quer da segunda) enquanto que o número plaquetário foi obtido através de exame de sangue periférico (hemograma completo) no dia da avaliação.

Metódos Estatísticos

Para a análise da sobrevida foram construídas curvas de Kaplan-Meier. Foram comparadas estratificações induzidas por variáveis categóricas pelo teste de log-rank através do programa WINSTAT 3.1 (Kalmia Co Inc, Cambridge< MA, Estados Unidos).

Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Variáveis contínuas foram avaliadas individualmente pelo modelo univariado da regressão de azares proporcionais de COX. Para avaliar as variáveis significativas em conjunto, foi utilizado o modelo multivariado de regressão de azares proporcionais de Cox (regressão “*stepwise*”). O material obtido da pele, glândula salivar e mucosa bucal foi estudado isolada e comparativamente. Outros dados, como a idade do paciente, doença de base, sexo do doador, o tipo de transplante realizado, a mediana do nível de ciclosporina sérico até o momento da biópsia assim como o número de plaquetas, foram comparados com os achados histológicos, no estudo dos fatores prognósticos para o aparecimento da GVHD crônica e sobrevida dos pacientes (SIMON R *et al.*, 1994; FLETCHER, 1996; METZE, 1998).

Resultados

Resultados no Dia +100

Quarenta e cinco pacientes puderam ser avaliados no dia +100 pós TMO.

No grupo, 19 pacientes eram mulheres e 26 homens, com idade média de 36 anos (4-57 anos). A idade do paciente, a doença que foi tratada com o transplante, o sexo do doador, o tipo de transplante realizado, a mediana do nível sérico de ciclosporina até o momento da biópsia assim como o número de plaquetas, foram comparados com os achados histológicos como teste preditivo para o desenvolvimento da GVHD crônica e sobrevida dos pacientes. Os resultados estão relacionados nas tabela abaixo (Tabela 10):

Tabela 10. Situação clínica dos pacientes estudados submetidos ao Transplante de Medula Óssea

NIP	SEXO	IDD	DOA	DIAGN	TX
1	F	24	F	LMC-FC	MO
2	F	27	F	LMC-FC	MO
3	F	37	M	AA	MO
4	F	47	M	LMC-FC	MO
8	M	41	F	LMC-FC	MO
9	F	14	F	LLA-Rel2	MO
10	M	19	F	LLA-RC1	MO
11	F	5	F	LMC-FC	MO
12	M	21	M	AA	MO
13	M	19	M	AA	MO
14	M	33	M	LMC-FC	MO
15	F	34	M	LMA-RC1	MO
16	M	43	F	LMA-Refr	CTP
17	M	24	F	AA	MO
18	M	32	F	LMC-FC	MO
19	M	29	F	AA	MO
20	M	41	M	SMDhipo	CTP
21	M	46	M	LMC-FC	MO
22	F	28	F	LMA-rel1	CTP
23	F	50	F	LMC-FC	MO
27	M	32	F	AA	MO
29	F	14	M	LMC-FC	MO
30	M	7	M	LLA-Rel2	MO
34	F	44	M	LMC-FC	MO

cont. da tabela 10. Situação Clínica dos Pacientes submetidos ao Transplante de Medula Óssea

NIP	SEXO	IDD	DOA	DIAGN	TX
35	M	20	M	SMD	CTP
36	M	12	M	AA	MO
40	M	21	F	AA	MO
41	M	44	M	LMC-FC	CTP
43	M	39	M	LMC-FC	CTP
44	M	40	M	LNH-BG	CTP
45	F	21	M	AA	MO
46	M	21	F	AA	MO
49	F	45	M	AA	MO
51	F	28	M	LLA-Rec1	MO
52	M	32	F	LMA-Rec1	CTP
53	F	16	M	LMA-Rec2	CTP
54	F	10	M	AA	MO
55	F	21	M	LMC-FC	MO
56	M	31	M	LMC-FC	CTP
57	M	57	F	LMC-FC	MO
58	M	31	F	LMA-Rec1	CTP
59	F	16	F	LLA-Refr	MO
60	M	30	F	LMC-FC	CTP
61	F	37	M	AA	MO
63	M	48	F	SMD	CTP

NIP - número individual do paciente; IDD - idade; DOA - sexo do doador; DIAGN - diagnóstico; TX- tipo de transplante; LMC-FC - leucemia mielóide crônica, fase crônica; AA- anemia aplástica; LLA - leucemia linfóide aguda; LLA - leucemia linfóide aguda; LMA - leucemia mielóide aguda; LNH-BG - linfoma não Hodking, baixo grau; SMD - síndrome mielodisplásica; M - sexo masculino; F - sexo feminino

Refr - refratária; Rec 1 ou 2 - primeira ou segunda recaída; Rem 1 ou 2 - primeira ou segunda remissão; HIPO - hipocelular

MO - medula óssea; CTP - células tronco-periféricas;

BU - bussulfan, CY - ciclofosfamida; VP - vepeside; CsA - ciclosporina; MTX - metotrexate; Pred - prednisolona

Resultados Obtidos na Análise do Dia +100

Tabela 11. Resultados obtidos na avaliação do dia + 100

NIP	P	GLD	XER	MUC	LL	GVHda	SEAT	PLQ x 10 ⁹	CsA
1	1	1	S	1	N	+	A	39	965,36
2	1	1	S	1	N	+	A	54	338,2
3	1	1	S	1	N	-	A	254	489,32
4	1	1	S	1	N	-	A	101	282,41
8	1	1	S	1	N	-	A	82	229
9	1	1	N	1	N	+	A	49	649,9
10	1	1	S	1	N	-	A	103	480,8
11	1	1	N	1	N	-	A	148	258,8
12	1	1	N	1	N	+	A	271	397,75
13	1	1	N	1	N	-	A	201	341,2
14	1	1	N	1	N	-	A	142	318,75
15	1	2	N	1	N	-	L	140	363,25
16	1	1	N	1	N	+	A	157	556,87
17	1	1	N	1	N	-	A	124	559,09
18	1	1	N	1	N	+	A	57	365,5
19	1	1	N	1	N	-	A	99	416,53
20	1	MI	S	3	S	-	L	77	292,5
21	1	MI	S	1	N	+	A	54	376,47
22	1	1	S	1	N	+	A	240	567,5
23	1	MI	S	2	S	+	E	36	229
27	1	MI	N	3	S	-	L	104	148,5
29	2	2	S	MI	N	+	L	24	281,5
30	1	1	N	1	N	-	A	175	551,5
34	1		S	1	N	+	A	72	167,71
35	1	1	N	1	N	+	A	31	222,5
36	1	1	N	1	N	-	A	102	117,5
40	1	1	N	1	N	-	A	120	347
41	1	1	S	1	N	+	A	44	386,25
43	1	2	S	1	N	+	A	4	464
44	1	2	S	1	N	-	A	80	295,5
45	1	1	N	1	N	-	A	117	156
46	1	1	N	1	N	-	A	112	312
49	1	1	N	1	N	-	A	161	201,6
51	1	1	S	1	N	+	A	96	724,43

NIP	P	GLD	XER	MUC	LL	GVHDa	SEAT	PLQ x 10 ⁹	CsA
52	1	1	S	1	N	+	A	92	296,92
53	1	1	S	1	N	-	A	120	483,55
54	1	1	N	1	N	-	A	170	324,52
55	1	2	S	1	N	-	L	89	395,87
56	1	1	S	2	S	+	L	94	373,5
57	1	2	S	1	N	-	L	67	646,5
58	1	1	S	1	N	+	A	20	463,47
59	2	1	S	1	N	-	L	125	264
60	2	3	S	3	S	-	L	133	432,77
61	1	1	N	1	N	-	A	115	494
63	2	3	S	1	N	+	E	194	415,36

NIP= número individual do paciente; P= grau histológico da biópsia de pele; GLD= grau histológico da biópsia de glândula salivar; MUC = grau histológico da biópsia de mucosa oral; GVHDa =antecedentes de doença do enxerto contra o hospedeiro aguda; SEAT= classificação de Seattle; PLQ = n° de plaquetas; Csa = mediana do nível de ciclosporina sérica do paciente até o momento da biópsia; LL= lesão liquenóide clínica; ; XERO - xerostomia clínica; MI= material insuficiente; A= ausente; L= localizada; E= extensa; S - sim; N - não; (+) positividade para GVHDa; (-) negatividade para GVHDa; 1, 2 ou 3 = grau histológico segundo a classificação de Horn

Os pacientes de NIP 5, 6, 7, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 42, 47, 48, 50 e 62 não participaram do estudo

Resultados Clínicos e Histológicos no dia +100

Toxicidade

Paralelamente aos achados relativos às alterações provocadas pela doença do enxerto contra-o-hospedeiro, observou-se a permanência das alterações compatíveis com toxicidade quimioterápica nos exemplares biopsiados mesmo 100 dias após o transplante. Alterações epiteliais, tais como pigmentação pelo bussulfano em camada basal, como células com alterações volumétricas desproporcionais entre núcleo/ citoplasma, foram freqüentemente encontradas, além de alterações metaplásicas em anexos epiteliais. Em mucosa bucal, numa situação muito semelhante à da pele, foram observadas alterações degenerativas e alterações volumétricas (núcleo/citoplasma) do epitélio. Em glândula salivar, essas alterações relativas ao condicionamento eram mais marcantes nos ductos. Quanto à GVHDC, foi observada diferença de acometimento

entre os lóbulos de uma mesma glândula. A representatividade do processo inflamatório se dava de maneira diferente entre eles em intensidade de agressão. A presença do processo degenerativo acinar com fibrose focal em muitos lóbulos além das alterações metaplásicas em ductos salivares e manutenção das alterações celulares provocadas pela quimioterapia estavam presentes também nos períodos além do 100º dia de TMO.

Pele

Foram coletadas 45 biópsias de pele de 45 pacientes, das quais 41 não apresentaram alterações histológicas. Em 4 amostras, foram encontradas alterações histológicas compatíveis com GVHD Grau II de LERNER. Dessas, 3 casos mostravam acometimento simultâneo de outros tecidos: 2 de glândula salivar e 1 de glândula e mucosa. Alterações clínicas em pele, como xerodermia foram as mais frequentes. Os pacientes que demonstraram alterações histológicas em pele (NIP 29, 59, 60 e 63) apresentaram GVHD progressivo.

Glândula Salivar

As amostras de glândula salivar menor apresentaram material satisfatório para análise em apenas 40 pacientes. Em 32 delas não foram encontradas alterações sugestivas da presença da GVHD crônica (Grau I de HORN). Em 8 amostras de glândula salivar foram encontradas alterações histológicas: 6 pacientes com Grau II, sendo que em 1 havia concomitância com acometimento da pele e, em 2 com pele e mucosa. Alterações de Grau III foram vistas em dois pacientes. A queixa clínica mais frequentemente relatada pelos pacientes foi em relação à sensação de xerostomia, na maioria das vezes confirmada pelo exame clínico bucal. Histologicamente, os pacientes que demonstraram alterações em glândula salivares (NIP 29, 57, 60 e 63) apresentaram

GVHDc progressivo, enquanto que os de NIP 15 e 55 não houve precedência de qualquer manifestação da forma aguda.

Mucosa Bucal

Do total de 45 pacientes, foram obtidas 44 amostras satisfatórias de mucosa bucal: duas positivas para GVHD crônica Grau II de HORN; 3 Grau III histológico de HORN e as restantes não apresentaram qualquer alteração histológica. Clinicamente todos os pacientes com positividade histológica, apresentaram lesões esbranquiçadas em mucosa bucal. Desses, os de NIP 23, 56 e 60 apresentaram GVHDA, e os de NIP 20 e 27 não.

Classificação Clínica da Extensão da GVHD Crônica

Foram encontrados 9 pacientes com GVHD crônica localizada (principalmente na boca), segundo os critérios determinados pelo grupo de Seattle e 2 com a forma extensa. Todos os outros pacientes não apresentavam quaisquer sinais clínicos (ou histológicos) da GVHD crônica.

Número de Plaquetas

O nível mediano das plaquetas no dia +100 foi de $102 \times 10^3 / l$ sangue ($4,0 - 271 \times 10^3 / l$ sangue).

Nível Sérico de Ciclosporina

A mediana do nível sérico de ciclosporina ao redor do dia +100, foi $673,8 \text{ ng} / \text{ml}$ de sangue ($117,5 - 847,86 \text{ ng} / \text{ml}$ de sangue)

Aspectos Clínicos Bucais

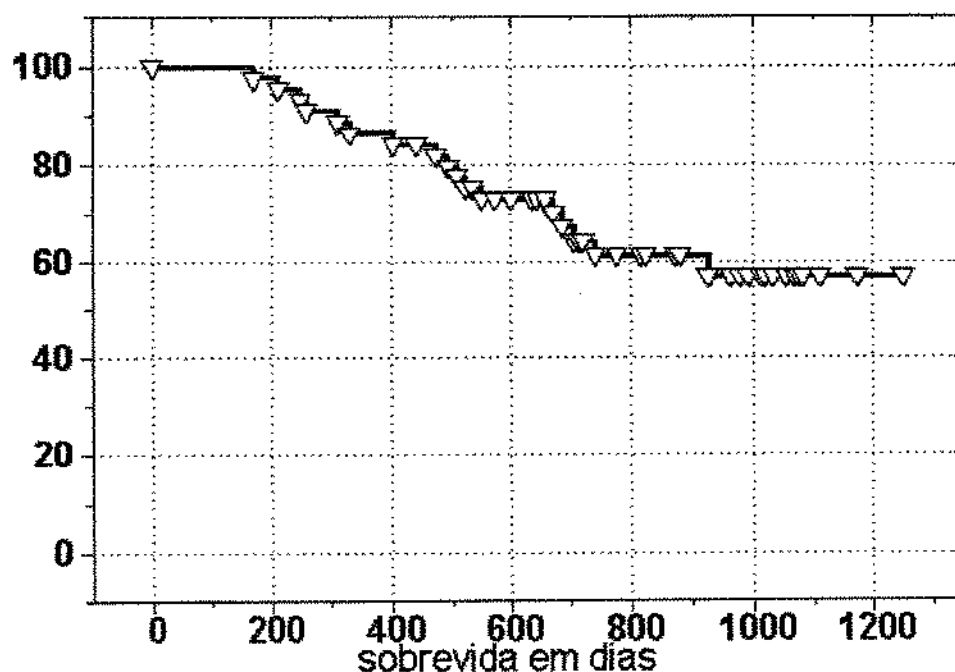
Xerostomia foi observada em 25 pacientes, sendo que, das 40 biópsias de glândulas salivares estudadas, em 8 se identificou GVHDc à histologia. Lesões liquenóides foram encontradas em 5 pacientes e confirmadas à histologia.

Valor Diagnóstico da Biópsia de Pele, Mucosa Bucal e Glândula Salivar Menor no Dia 100

Quando comparados os achados das biópsias da pele, glândula salivar e mucosa bucal, no sentido de se estudar qual delas teria maior valor diagnóstico no dia 100 para GVHD crônica, encontramos uma não associação entre a presença de GVHD crônica e os achados histológicos em pele, mucosa bucal e glândula salivar ($\chi^2 > 0,05$) para todos os 3 parâmetros

Análises Univariadas dos Resultados Histológicos Frente à Curva de Sobrevida Kaplan-Meier dos Pacientes Estudados, no Dia 100

Gráfico 1. Curva de Sobrevida dos Pacientes Estudados (n=45)



Pele

O teste não foi realizado com os resultados das biópsias da pele, por ser encontrada somente uma classe com 4 elementos distintos (4 pacientes) na classificação Grau I, não se justificando assim a realização do mesmo.

Mucosa Bucal / Glândula Salivar

Os resultados da mucosa bucal e da glândula salivar não demonstraram quaisquer valores estatisticamente significativos, com um $p > 0,05$ (Cox-Mantel).

Presença Prévia de GVHDa

A presença de GVHDa anterior demonstrou ser um fator de prognóstico desfavorável na sobrevida dos pacientes Log-rank Tes - ($p=0,0016$).

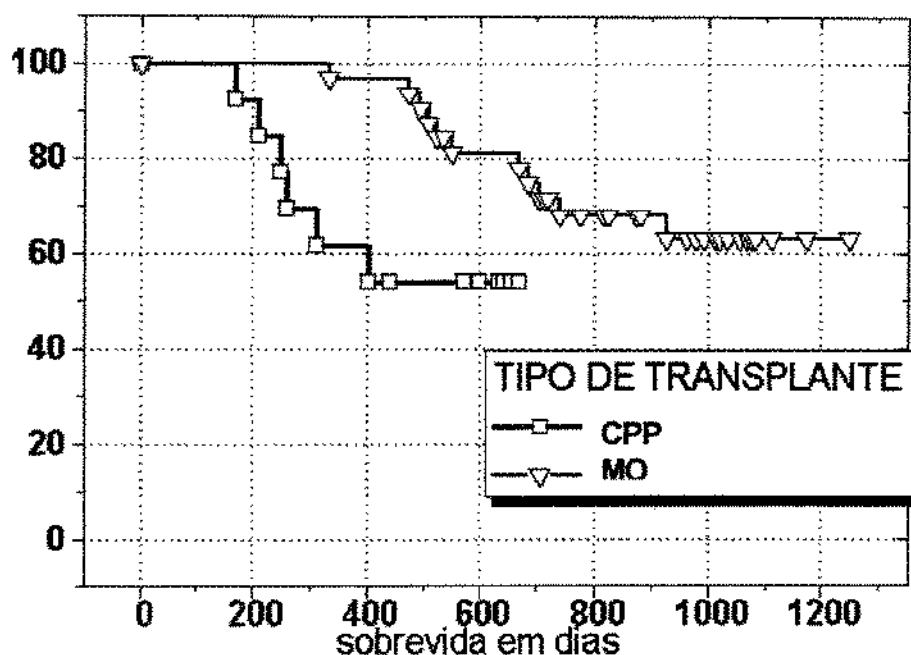
Classificação da Extensão Clínica da GVHDc

Não se observou importância significativa quando analisada a extensão da GVHD no dia 100, quanto à sobrevida dos pacientes. - Cox-Mantel ($p=0,2$).

Tipo de Coleta de Células Progenitoras

Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de coleta de células progenitoras, sendo que nos pacientes receptores de transplantes em que a coleta foi obtida através de células progenitora periféricas (CPP) foi observada menor sobrevida ($p=0,017$).

Gráfico 2. Diferenças entre os tipos de coletas de células progenitoras em relação à sobrevida dos pacientes em dias (n=45)



Sexo do Doador

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os sexos dos doadores, frente a sobrevida dos pacientes na análise do dia +100 ($p>0,05$). Dentre os doadores, 21 eram do sexo feminino e 24 masculino. Seis pacientes receptores de medula do sexo feminino desenvolveram GVHDc no dia +100 e 5 dos que receberam enxerto de doadores masculinos, apresentaram GVHDc no mesmo período.

Plaquetas, CsA e Idade

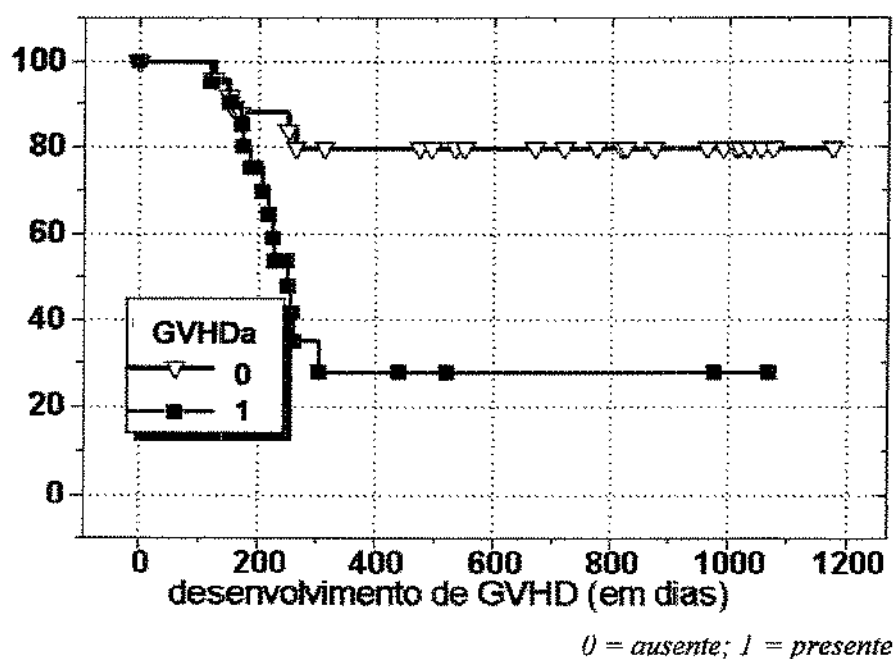
Na regressão univariada de COX obtivemos um resultado de importância significativa na sobrevida em relação ao nível sérico de ciclosporina ($p=0,0031$), enquanto que a idade do paciente assim como o número de plaquetas não foram importantes estatisticamente.

GVHD Crônica: Fatores Preditivos (dia 100)

GVHD Agudo

A presença pregressa da GVHDA apresentou importância estatisticamente significativa no aparecimento posterior da GVHD crônica ($p=0,00162$).

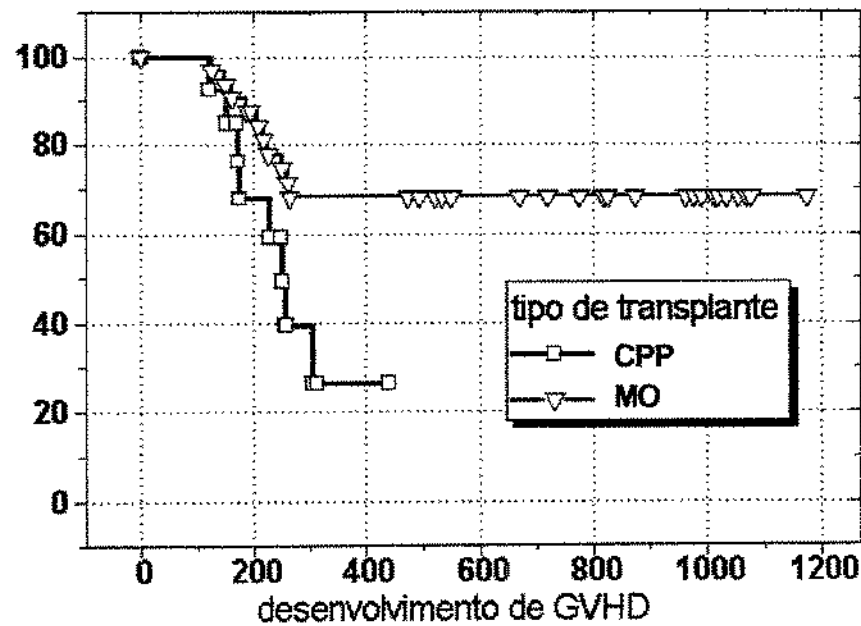
Gráfico 3. Correlação entre a presença pregressa da GVHDA e o desenvolvimento posterior de GVHD crônica ($n=45$)



Tipo de Coleta no Transplante

A coleta de células progenitoras através de aspiração da MO demonstrou ser um fator estatisticamente significativo no desenvolvimento da GVHD crônica ($p=0,02331$).

Gráfico 4. Correlação entre o tipo de fonte de células progenitoras e o desenvolvimento de GVHDc no dia +100 (n=45)



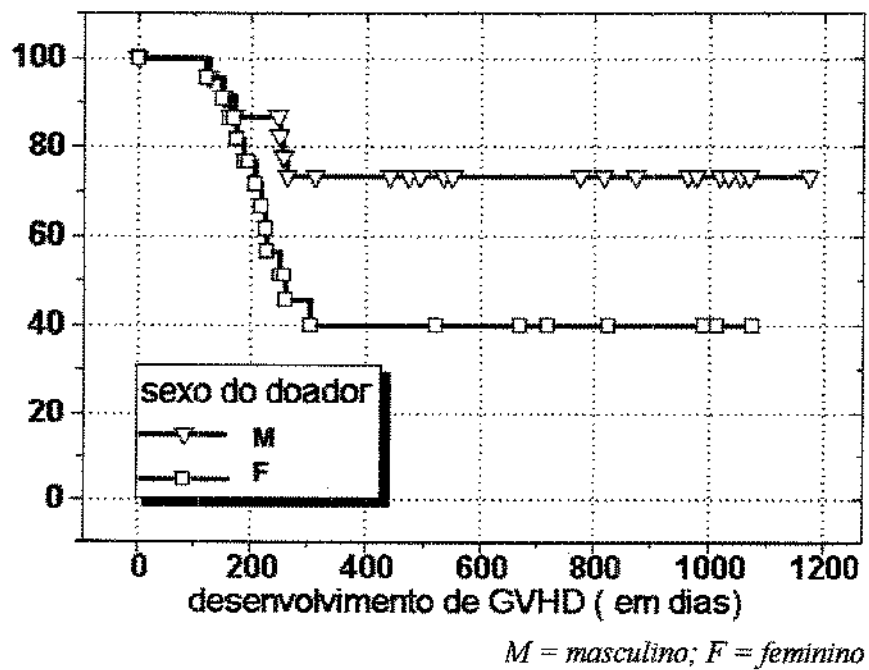
Pele / Mucosa Bucal / Glândula Salivar

Os achados histológicos da pele, da mucosa e glândula salivar não demonstraram valores estatisticamente significativos para o prognóstico de desenvolvimento da GVHD crônica no dia +100 pós-TMO (todos com $p > 0,05$).

Sexo do Doador

O sexo do doador, mostrou uma influência significativa no desenvolvimento da GVHD crônica ($p = 0,031$), ou seja, pacientes que receberam enxertos de doadores femininos desenvolveram GVHDc em maior frequência.

Gráfico 5. Correlação entre o desenvolvimento de GVHDc e o sexo do doador (n=45)



Resultados Posteriores ao Dia +100

Vinte e cinco pacientes, dos 45 iniciais, necessitaram de uma nova avaliação, por motivos anteriormente descritos. A mediana do período entre a avaliação do dia +100 e a segunda realizada, foi de 195 dias (104 – 304 dias). A tabela abaixo (Tabela 12) demonstra os resultados obtidos a partir dos novos exames realizados:

Tabela 12. Resultados da avaliação pós dia +100

NIP	TX	P	GLD	MUC	SEA	PLQ x10 ⁹	EXTRA	DB	CsA	ÓBITO
1	MO	1	2	1	E	146	Fig, Pl	187	403,11	GVHD
2	MO	1	2	1	E	257	Fig	250	593,43	REC
3	MO	1	2	1	L	258	-	300	75	
4	MO	1	1	1	E	174	Fig	125	230	
8	MO	3	2	MI	E	79	Pl	150	238,5	
9	MO	2	4	MI	E	186	TGLPl	226	641,4	GVHD
10	MO	1	MI	2	E	120	Fig	161	373	
15	MO	1	1	1	A	111	-	130	0	
16	CPP	2	1	1	E	155	Fig	171	692,87	
18	MO	2	2	1	E	164	-	218	0	GVHD
20	CPP	2	3	MI	E	97	-	250	138,5	
21	MO	3	3	2	E	96	Fig	260	238,5	GVHD
22	CPP	1	2	2	E	204	Fig, TGI	229	465,5	GVHD
23	MO	2	2	3	L	106	-	137	213	
27	MO	1	MI	1	A	124	-	148	89,6	
29	MO	1	1	1	E	79	Fig	208	242,5	
30	MO	1	1	2	L	193	-	150	265	REC
34	MO	1	2	1	L	81	-	195	143,25	
35	CPP	1	1	1	A	142	-	218	182,75	
43	CPP	2	2	3	E	124	Fig	257	57	
56	CPP	1	4	4	E	78	Fig	174	174	GVHD
57	MO	1	3	2	E	57	Fig	264	264	GVHD
58	CPP	1	4	2	L	20	-	104	140	REC
60	CPP	2	4	2	E	111	Fig	140	140	?
63	CPP	2	MI	MI	E	135	-	304	304	

NIP - número individual do paciente, TX - tipo de transplante; MO - medula óssea; CPP - células progenitoras-periféricas; P- grau histológico da biópsia de pele; GLD grau histológico da biópsia de glândula salivar; MUC - grau histológico da biópsia da mucosa bucal; MI - material insuficiente; SEA - classificação de Seattle; E- GVHDc extensa; L - GVHDc localizada; A- GVHDc ausente; EXTRA - sítios extras acometidos pela GVHDc; Fig - fígado; Pl - pulmão; TGI - trato gastrointestinal; DB - data da última biópsia no período pós dia 100; CsA - nível sérico mediano da ciclosporina até essa data; GVHD - (graft-versus-host disease); REC - recaída da doença de base; ? - sem causa conhecida.

Exame Histológico pós Dia 100

Toxicidade

Mesmo após um período maior que 100 dias pós TMO, alterações celulares relativas à toxicidade provocada pelo condicionamento (descritas anteriormente, na avaliação do dia +100) ainda foram observadas, mostrando assim sua permanência por longos períodos pós TMO.

Pele

Foram encontradas, em 15 pacientes, alterações epiteliais compatíveis com o Grau I (LERNER); em 10 pacientes alterações epiteliais de Grau II (LERNER). Desses, 8 pacientes evoluíram do Grau I para o Grau II e 2 pacientes mantiveram o mesmo Grau (II de LERNER) observado no dia +100.

Glândula Salivar Menor

Do total de 25 pacientes reavaliados, não obtivemos amostras satisfatórias de glândula salivar em 3 casos restringindo portanto nossa amostra a 22. Desses, 6 foram classificadas com o Grau I (HORN), sendo que em 4 houve manutenção das características encontradas no dia + 100, ou seja, foi mantido o Grau histológico I (HORN). Duas que foram classificadas como Grau II (HORN) no dia 100, na reavaliação passaram a Grau I (HORN). Em 9 casos as glândulas foram classificadas como Grau II (HORN), sendo que em 2 não foi possível a comparação com as do dia 100, por que não haviam sido representadas na biópsia daquela data. Seis mudaram de Grau I (HORN) no dia 100 para Grau II (HORN) e em um caso houve manutenção das características histológicas do dia 100 (grau II). Foram encontradas em 3 casos, alterações Grau III (HORN), sendo que houve mudança em um caso de Grau II para III (HORN). Nos outros dois não foram obtidas amostras satisfatórias no dia 100. Grau IV foi encontrado em 4 casos analisados. Desses, 3 sofreram alteração de Grau I para IV e somente um de Grau III para IV (HORN). Tabela 13.

Tabela 13. Tabela demonstrativa da evolução das alterações histológicas em glândulas salivares menores encontradas no mesmo paciente durante a avaliação do dia +100 e posterior a essa

	Evolução	
	+ 100	>100
	dia 100	Posterior ao dia 100
Grau I	(4) Grau I	Grau I
	(2) Grau II	Grau I
Grau II	(2) MI	Grau II
	(6) Grau I	Grau II
	(1) Grau II	Grau II
Grau III	(2) MI	Grau III
	(1) Grau II	Grau III
Grau IV	(3) Grau I	Grau IV
	(1) Grau III	Grau IV
		MI (3)
n	25	25

MI= material insatisfatório

Mucosa Bucal

Do total de 25, obtivemos amostras satisfatórias de 21 pacientes. Grau I foi observado em 11 casos. Nesses, 9 mantiveram as características histológicas encontradas anteriormente - Grau I. Uma amostra mudou de Grau III para o Grau I e outro caso não havia sido avaliado anteriormente. Alterações de Grau II foram encontradas em 7 casos: 6 anteriormente classificados como Grau I e um mantendo as alterações de Grau II (HORN). Grau III foi observado em 2 casos, sendo que 1 foi classificado anteriormente como Grau II e outro como Grau I. Somente em uma amostra foi verificada a presença de alterações Grau IV, que havia sido classificada como

grau I no dia. Dentre as que não foram representadas na avaliação posterior ao dia +100, 3 foram classificadas como Grau I no dia 100 e uma Grau III (HORN). (Tabela 14).

Tabela 14. Tabela demonstrativa da evolução das alterações histológicas em mucosa bucal encontradas no mesmo paciente durante a avaliação do dia +100 e posterior a essa

	Evolução	
	+100	>100
	dia 100	posterior ao dia 100
grau I	(9) Grau I	Grau I
	(1) MI	Grau I
	(1) Grau III	Grau I
	(3) Grau I	MI
grau II	(6) Grau I	Grau II
	(1) Grau II	Grau II
grau III	(1) Grau II	Grau III
	(1) Grau I	Grau III
	(1) Grau III	MI
grau IV	(1) Grau I	Grau IV
n	25	25

MI= material insatisfatório

Nível Mediano de Ciclosporina Sérica

O nível mediano da ciclosporina sérica foi de 230 ng / l de sangue (0 – 693,0ng / l de sangue).

Número de Plaquetas

A mediana do número de plaquetas na segunda avaliação foi $124 \times 10^3/l$ de sangue ($20 \times 10^3 - 258 \times 10^3/l$ de sangue)

Classificação Clínica da Extensão da GVHDc

Em 17 pacientes (dos 25) com GVHDc em avaliação posterior ao dia +100, apresentaram a forma extensa da síndrome por acometimento simultâneo de vários órgãos. Dentre esses, o fígado foi o órgão mais frequentemente afetado (aumento dos índices de fosfatase alcalina, bilirrubinas, TGO e TGP) seguido pelo pulmão (bronquiolite obliterante) e o trato gastrointestinal (disfagia, perda de peso). O paciente de NIP 4 com a forma extensa da síndrome, apesar de não apresentar alterações histológicas, apresentou icterícia (decorrente de disfunção hepática) associada à diminuição da produção lacrimal, detectada pelo teste de Shimmer ($<0,05\text{cm}$). Em 5 pacientes, a GVHDc foi localizada principalmente na cavidade bucal, com xerostomia e pseudo-leucoplasia pilosa em borda lingual no paciente de NIP 3. Em 3 pacientes, não foram encontrados quaisquer alterações histológicas (NIP 15, 27 e 35). Nesses 3 pacientes a justificativa da realização da segunda biópsia se deveu à suspeita clínica da GVHDc que incluía icterícia (justificada por uma insuficiência hepática no paciente de NIP 15) e xerostomia acentuada nos outros dois pacientes (NIP 27 e 35), provavelmente residual à quimioterapia.

Óbitos

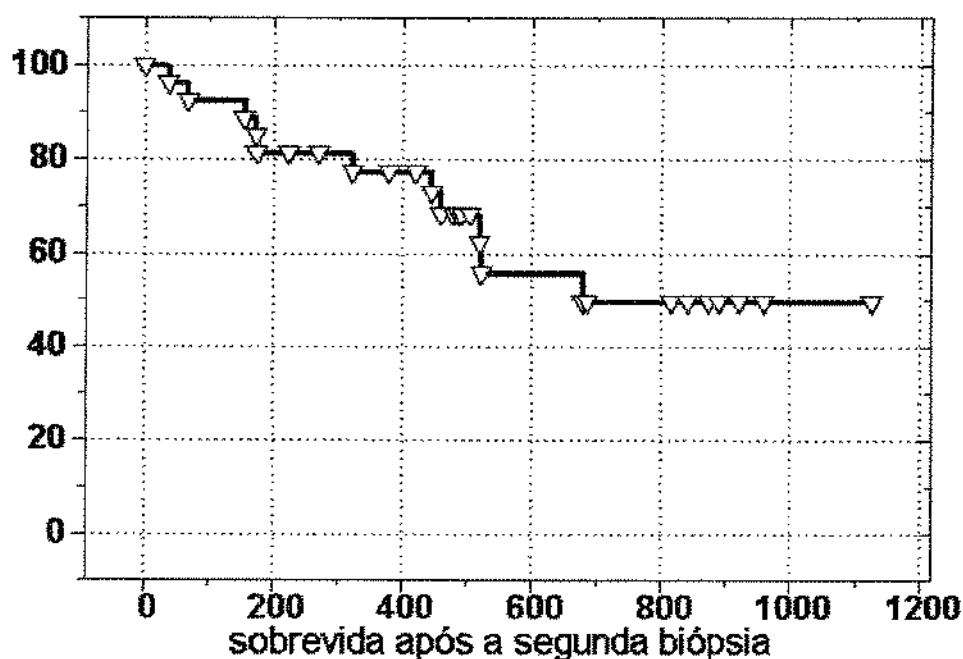
Onze pacientes dos 25 foram a óbito. Desses, 7 em decorrência da GVHD crônica, 1 por causa não relacionada ao TMO e 3 por recidiva da doença. Dos que morreram devido à recidiva ou mesmo por causa desconhecida, 2 apresentaram GVHD aguda. Não foram encontradas alterações histológicas em pele em 3 pacientes e, somente em 1, alterações em pele Grau II. Daqueles que faleceram com GVHD crônica, 4 não apresentaram alterações histológicas na pele e

3 Grau II na segunda biópsia cutânea. Na glândula salivar, 3 passaram de Grau I para Grau II na segunda avaliação; 2 de Grau I para IV; 1 de II para III e para um foi determinado Grau III sem condições equiparativas anteriores. Na mucosa bucal, 2 se mantiveram em Grau I, um não foi avaliado na segunda fase e 3, passaram de Grau I para II e 1 de I para IV.

Análise de Sobrevida Após a Segunda Biópsia (> 100 dias)

Curva de sobrevida dos pacientes após a segunda biópsia. O zero indica o dia da biópsia realizada no primeiro paciente que necessitou de reavaliação:

Gráfico 6. Curva de sobrevida após a segunda biópsia (n=25)



Análise Quanto ao Sexo do Doador

O sexo do doador não demonstrou ter importância significativa quanto à sobrevida dos pacientes ($p>0,05$) à análise posterior do dia +100. Interessante notar que dos pacientes rebiópsiados, 15 receberam enxertos provenientes de doadores femininos e desses, 12

desenvolveram GVHDc extensa e 1 localizado. Ainda desses que receberam enxertos femininos, 8 morreram, sendo que 5 devido à GVHDc. Do restante, 10 pacientes receberam enxertos provenientes de doadores masculinos sendo que 6 desenvolveram GVHDc extensa e 3 localizados. Desses, 2 morreram devido à GVHDc.

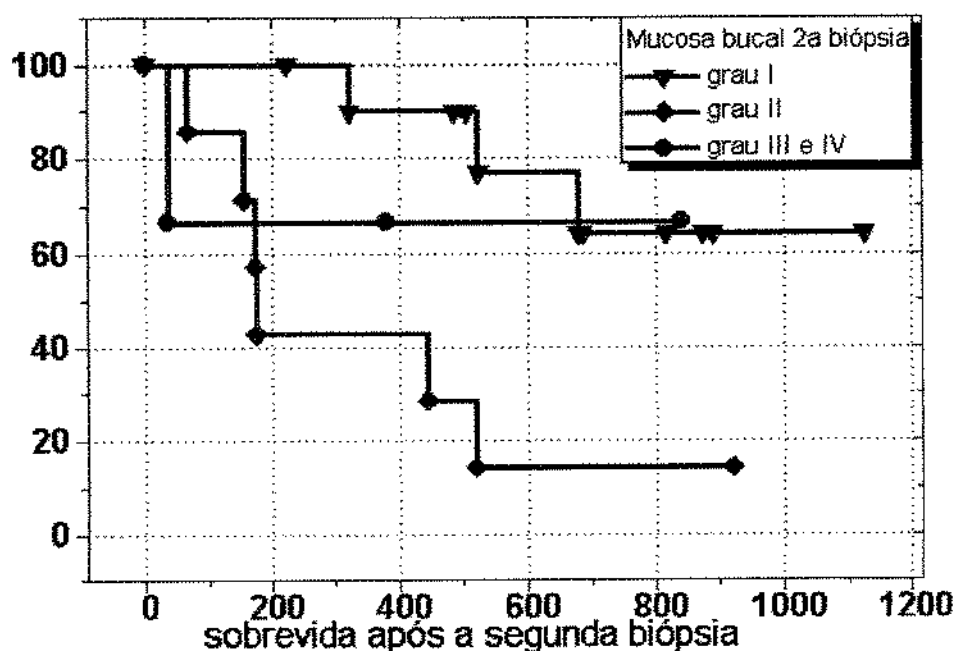
Pele

A análise dos resultados na pele continuou a não mostrar importância estatisticamente significativa, em relação à sobrevida do paciente ($p>0,05$).

Mucosa Bucal

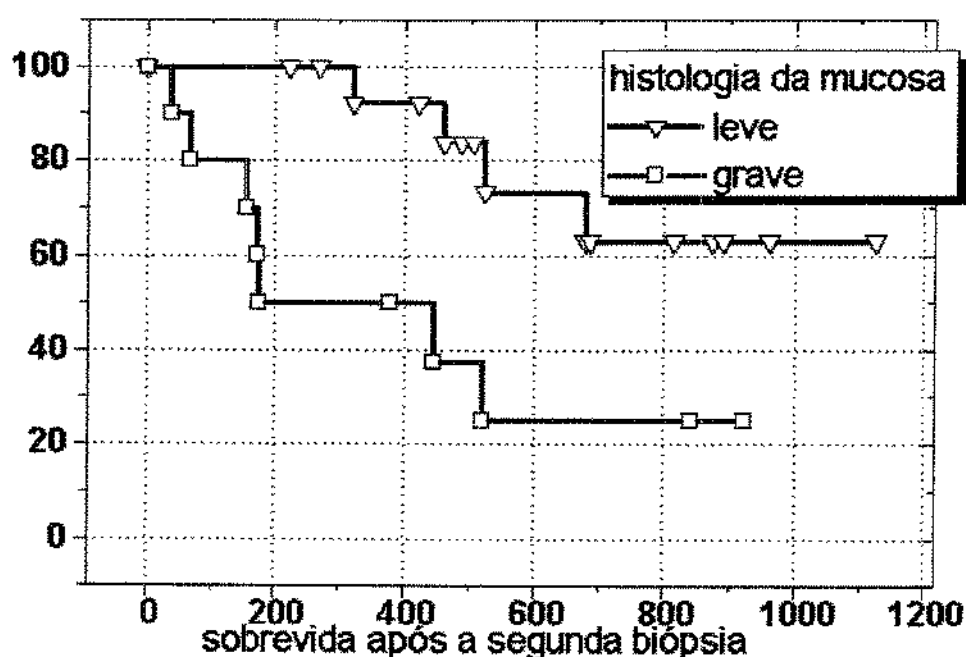
A avaliação dos achados histológicos da mucosa bucal posteriormente ao dia 100 se baseou preliminarmente na análise da amostra em 3 sub-grupos: Grau I; Grau II; Graus III e IV, resultando em um $p=0,02$, estatisticamente significativo.

Gráfico 7. Sobrevida dos pacientes analisados no segundo período pós dia 100, em relação ao agrupamento dos achados histológicos em mucosa bucal, em Grau I, Grau II e Grau III-IV (n= 21)



Os achados histológicos da mucosa bucal foram ainda agrupados em 2 níveis de gravidade – Leve, incluindo o Grau I e Grave, incluindo os Graus II, III e IV. A análise dos dados resultou em um $p=0,001$, estatisticamente significativo em relação à sobrevida dos pacientes.

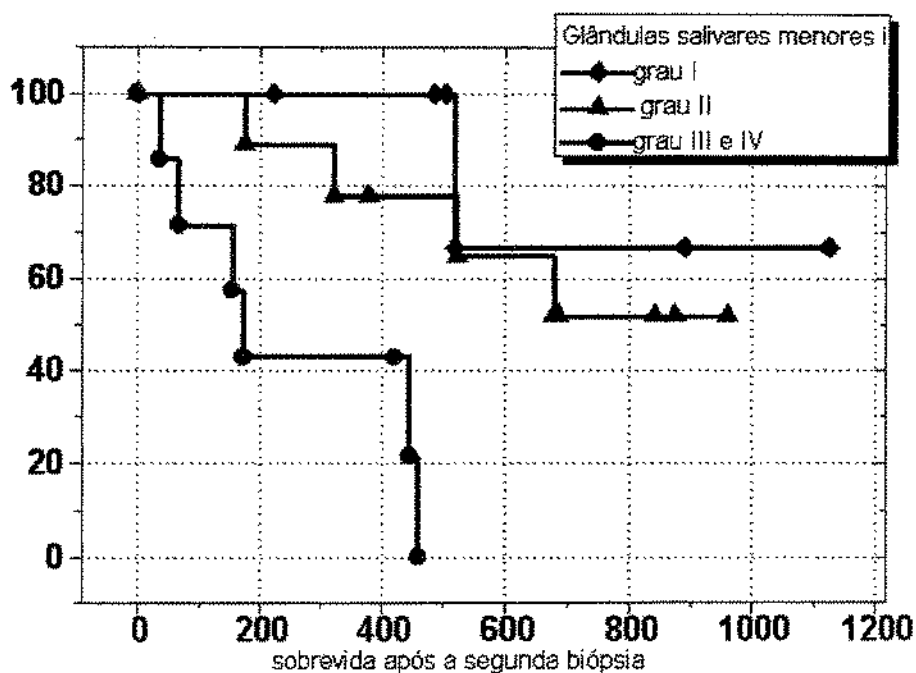
Gráfico 8. Análise binarizada dos graus histológicos em mucosa bucal após a segunda biópsia, onde leve inclui os Graus I enquanto que Grave, Graus II, III e IV ($n= 21$)



Glândula Salivar

Da mesma forma que para a mucosa bucal, os achados histológicos em glândula salivar foram agrupados em 3 sub-grupos: Grau I; Grau II; Graus III e IV, resultando em um $p=0,009$ estatisticamente significativo.

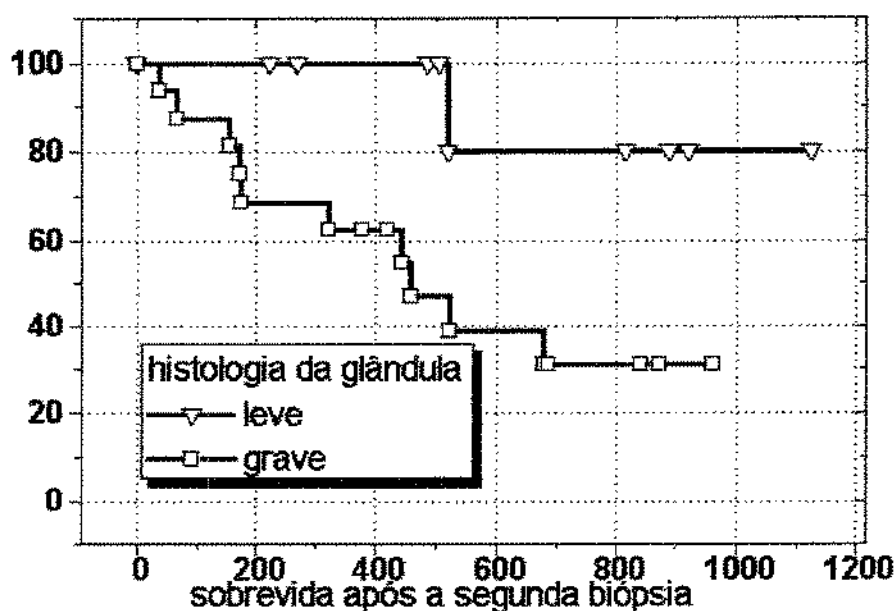
Gráfico 9. Sobrevida dos pacientes analisados no segundo período pós dia 100, em relação ao agrupamento dos achados histológicos em glândula salivar menor, em Grau I, Grau II e Grau III-IV (n=22)



Glândula Salivar Menor

Quando agrupados os índices Grau I como Leve e Graus II, III e IV como Grave, encontramos, em análise binarizada, um resultado de $p=0,02706$, estatisticamente significativo em relação à sobrevida dos pacientes.

Gráfico 10. Análise binarizada dos graus histológicos glândula salivar menor após a segunda biópsia, onde leve inclui o Grau I enquanto que grave, Graus II, III e IV (n=22)



Análise dos Parâmetros Histológicos Quanto à Sensibilidade do Exame Para o Diagnóstico da GVHDc

A análise comparativa dos graus de acometimento entre pele, glândula salivar e mucosa bucal, não pôde ser realizada por se basearem em diferentes parâmetros de graduação entre pele e os outros dois tecidos. Somente foi realizada entre a glândula salivar e a mucosa bucal, por obedecerem aos mesmos parâmetros.

A análise comparativa da intensidade da reação na doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica entre a mucosa bucal e glândula salivar revelou nesta amostra, no período posterior ao dia 100, maior intensidade na agressão da GVHDc na glândula salivar que na mucosa bucal ($p=0,03$). Foram encontradas atipias ductais, áreas de necrose acinar, dilatação ductal com *plug* de saliva,

intercaladas muitas vezes com regiões de preservação acinar, nem sempre com um infiltrado linfocitário importante. Em alguns exemplares ainda pudemos observar plasmócitos em lóbulos de glândulas salivares, sendo que poucos ou quase raros eosinófilos.

Discussão

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (*chronic graft-versus-host disease* GVHDc) é uma das mais sérias complicações após o transplante alogênico de medula óssea. Foi identificada após a década de 70, quando pacientes submetidos ao TMO passaram a sobreviver tempo suficiente para a sua manifestação. É uma síndrome que concilia características de autoimunidade e imunodeficiência, com uma incidência de 30% a 50% dos TMOs alogênicos e alta morbidade e mortalidade (ATKINSON K *et al.*, 1990).

O diagnóstico precoce é importante auxiliar para o seu controle interferindo tanto na evolução da síndrome como em seu prognóstico. Os critérios diagnósticos incluem os resultados de testes laboratoriais determinantes das alterações dos órgãos-alvo (como fígado por exemplo), assim como biópsias de pele e mucosa bucal incluindo glândula salivar menor.

Complicações bucais, especialmente a xerostomia em pacientes com GVHDc foram documentadas como característica da doença (SALE GR, 1984). A xerostomia, uma das queixas mais comuns de nossos pacientes e que em exame clínico é confirmada pelos parâmetros objetivos de exame, pode também estar relacionada às consequências tardias do uso das drogas no período de condicionamento (NAKAMURA *et al.*, 1996). CHAUSHU *et al.*, (1995) estudando os efeitos dos regimes de condicionamento (com radio e quimioterapia) em parótida, demonstrou efeitos irreversíveis no fluxo salivar daqueles submetidos à ICT em cerca de 60% a 68% entre 2 a 5 meses após o TMO. Naqueles submetidos ao regime com quimioterapia, o fluxo a aparentemente voltou ao normal ao redor de 30 dias pós-TMO, com recuperação parcial em cerca de 2 a 5 meses. O autor ainda discutiu os efeitos dessa recuperação parcial, salientando a permanência dos efeitos da quimiotoxicidade (em ácinos) e efeitos permanentes da radioterapia (danos acinares e endoteliais). A avaliação sistemática do fluxo salivar não é feita em nosso serviço, o que dificulta a correlação quantitativa e qualitativa das possíveis alterações em glândulas salivares pós quimioterapia.

Interessante notar ainda, o aumento de microorganismos cariogênicos em pacientes com GVHDc. DENS *et al.*, (1996) relata um aumento das UFC de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillos* em pacientes com GVHDc, associado à diminuição da capacidade tampão da saliva e à redução do fluxo salivar. Em nosso estudo, o aumento do número de cárie foi observada em período tardio pós-TMO, em pacientes portadores de GVHDc com alto grau de destruição acinar.

Lesões liquenóides no período tardio do transplante são reconhecidas como patognomônicas da GVHD crônica (NAKAMURA *et al.*, 1996). Em nosso trabalho, encontramos, na avaliação do dia +100, 5/45 pacientes com lesões liquenóides em mucosa bucal, enquanto que na avaliação posterior ao dia +100 (104 a 304 dias), esse número aumentou para 10/25. Interessante notar que o paciente de NIP 27 apresentou lesões liquenóides em mucosa jugal e labial no dia 100, grau III histológico, mas na segunda avaliação, “regrediu” para grau I, espontaneamente. É possível que as lesões brancas bucais observadas à avaliação protocolar do dia 100 refletissem, ainda, manifestações da mucosa ao uso das drogas e, portanto, não estivessem vinculadas ao desenvolvimento da GVHD crônica. Estomatites liquenóides em pacientes não oncológicos são manifestações do líquen plano, do lúpus eritematoso e outras doenças auto-imunes, das viroses, dos processos irritativos, pré-neoplásicos, da farmacodermia e outros. Assim, não seria possível inferir que todas as lesões brancas dos pacientes por nós estudados representavam o acometimento bucal do GVHD crônico (AKOSA & LAMPERT, 1991).

NAKAMURA *et al.*, 1996, encontrou lesões liquenóides bucais em 11/36 pacientes observados e como em nossos pacientes, havia uma distribuição em mucosa jugal, labial, e nos casos mais extensos, em toda a mucosa bucal. Em todos os pacientes examinados, as características clínicas da lesão foram compatíveis aos achados histológicos. A forma ulcerada e atrófica da lesão liquenóide foi encontrada em 2 pacientes (NIP 20 e 60) na avaliação do dia

+100, enquanto que, na avaliação posterior, os pacientes de NIP 23, 60 e 63 mantiveram essa apresentação. A paciente de NIP 29, apesar de no momento de segunda biópsia não apresentar alterações histológicas em mucosa bucal, veio posteriormente a esse período, apresentar a forma ulcerada da doença.

Os achados histológicos em glândula salivar, assim como os de mucosa bucal, juntos, refletem o grau de envolvimento estrutural pela GVHD crônica na boca (NAKAMURA S *et al.* 1996; HIROKI A *et al.*, 1994). O exame histológico, demonstrou haver diferenças no grau de acometimento entre a glândula salivar e a mucosa bucal, num mesmo espécime. Os critérios descritos por HORN, (1995), demonstraram ser sensíveis a essas diferenças, facilitando de sobremaneira a interpretação variada da apresentação da GVHDc em glândula salivar e mucosa bucal. Aparentemente, a glândula salivar se mostrou mais freqüentemente afetada pelo infiltrado linfocitário do que a mucosa bucal, tanto na avaliação do dia +100 como na posterior a essa. Na avaliação do dia +100, encontramos 8/40 pacientes com grau igual ou maior que II na glândula salivar e 5/44 com grau acima ou igual a II na mucosa bucal. Entretanto, esses achados não foram significativos para o diagnóstico da GVHDc, como também não foram fatores preditivos para GVHDc, além de não serem também significativos para a sobrevida dos pacientes. Entretanto, interessante notar que em avaliação posterior ao dia +100, foi observada uma piora do Grau de agressão sobre a mucosa e a glândula salivar à partir daqueles achados no dia +100.

NAKAMURA *et al.*, 1996, correlacionou a extensão da GVHDc em outros órgãos com a intensidade de infiltração linfocitária da glândula salivar e da camada sub-epitelial da mucosa bucal com acometimento periductal, atrofia e destruição, dilatação ou degeneração de ácinos e fibrose ao redor de ductos salivares, além de degeneração basal em mucosa bucal. Coincidentemente aos achados do autor, os achados clínicos e histológicos em cavidade bucal e glândula salivar menor nos pacientes por nós observados, precederam as manifestações do

GVHDc de outros órgãos, principalmente do fígado (11/12) e do pulmão (3/3). Assim, nossos achados reforçam a hipótese deste autor de que os achados histológicos encontrados em cavidade bucal e glândula salivar menor possam representar o “*status*” da GVHD crônica com alta sensibilidade e especificidade.

A GVHD crônica associada a sintomas de xerofthalmia e xerostomia, é caracterizada como Síndrome Sjögren – *simile (like)*. Entretanto, diferenças entre as duas entidades já foram amplamente estudadas (HIROKI *et al.*, 1997), principalmente nos aspectos histológicos. Na Síndrome de Sjögren, o infiltrado periductal é bem característico enquanto que na GVHD crônica, o infiltrado é mais difuso. Na Síndrome de Sjögren, o infiltrado linfocitário é predominante do tipo CD 4+ e também são encontrados linfócitos tipo B. Já na GVHD crônica, o infiltrado linfocitário é predominantemente do tipo CD 8+.

NAKAMURA *et al.*, 1996, CHAUSHU *et al.*, (1995) ressaltaram que algumas das alterações das glândulas salivares, como destruição de ácinos e atrofia leve podem ser correlacionadas com o uso de drogas previamente ao TMO, o que é condizente com o encontrado em nosso trabalho. Pacientes sem GVHD na primeira avaliação (30/45 - 66,6%) apresentavam glândulas com alterações ductais e infiltrado inflamatório (grau I de HORN). Também 4 pacientes (NIP 4, 16, 30, 35), cujas biópsias mostravam alterações grau I nas duas avaliações, e outros dois (NIP 15 e 29) que apresentavam alterações grau II no dia +100 e, na segunda avaliação, grau I.

NAKLEH *et al.*, 1989, analisou o valor diagnóstico comparativo entre a glândula salivar e a mucosa bucal para a GVHD crônica. Observou 20% de resultados falso-negativos na mucosa bucal isolada e somente 11% na glândula salivar menor e concluiu que ambas são necessárias para o diagnóstico da síndrome. NAKAMURA *et al.*, 1996, demonstrou que o infiltrado inflamatório é freqüentemente observado em glândula salivar do que em mucosa bucal,

apontando assim para a maior sensibilidade da glândula em relação à mucosa. Em nosso trabalho, 6/40 pacientes no dia 100, mostravam alterações predominantemente em glândula salivar em comparação à mucosa bucal, enquanto que no mesmo período, somente 1/44 sobrepôs alterações em mucosa sobre glândula e em somente 1/45 houve concomitância entre a gravidade (grau III) em mucosa e glândula salivar. Na avaliação posterior ao dia +100, 9/22 amostras com alterações de glândulas salivares se sobrepuseram às da mucosa bucal. No resultado do segundo de exame, a glândula salivar exibiu maior grau de agressão linfocitária em relação à mucosa, com $p=0,03$, quando analisados sob os parâmetros diagnósticos para a GVHD crônica. Quando analisados os achados histológicos sob os parâmetros de sobrevida, encontramos correlações estatisticamente significativas entre os achados de glândula salivar e a sobrevida dos pacientes, quer na forma binarizada (leve ou grave) quer agrupadas segundo os graus (I, II - III e IV) ($p=0,009$ e $0,02$ respectivamente).

A pele tem sido descrita como um dos órgãos envolvidos na GVHD crônica e com ênfase no diagnóstico precoce da síndrome. Lesão liquenóide, assim como xerodermia, e quadro esclerodermóide num período tardio, são sinais característicos da síndrome (LAWLEY *et al.*, 1977). HIROKI *et al.*, 1994 encontrou 10/14 pacientes com envolvimento cutâneo pela GVHD crônica, mas alertou para a não-especificidade dos sinais e sintomas já que o “*rash*” pode ser semelhante nas reações a drogas.

No material por nós estudado, todas as biópsias cutâneas positivas (dia 100 ou posterior a esse) para a GVHD crônica correlacionaram-se à manifestação clínica da síndrome. Em nossa amostra, a pele não mostrou importância diagnóstica para a GVHD crônica, visto que somente 4 pacientes apresentaram alterações histológicas compatíveis com a síndrome no dia +100. Destes, 2 pacientes (NIP 60 e 63) apresentavam GVHD progressiva. Já na segunda avaliação, naqueles 25 pacientes que apresentavam a síndrome, em 10 havia envolvimento cutâneo, sendo que, em

4/10 pacientes havia concomitância com glândula salivar e em outros 4, com glândula e mucosa bucal. Em um paciente, o achado na pele foi isolado e em outro, não havia biópsia de mucosa e glândula salivar. Nenhum paciente, até o momento da segunda biópsia, apresentava formas graves de GVHD crônica da pele, como esclerodermia.

O *screening* diagnóstico para GVHDc proposto pelo grupo de TMO de Seattle, apesar de ser aleatoriamente realizado ao redor do dia +100, é considerado protocolar em diversos centros de TMO. Mesmo com a pouca sensibilidade dos exames histológicos para o diagnóstico da GVHDc nesse período, provavelmente pelo uso prolongado de medicações imunossupressoras (WAGNER *et al.*, 1998), pudemos observar que o maior número de pacientes que desenvolveram alterações histológicas em avaliação posterior ao dia +100, apresentaram de certa forma, uma evolução das alterações, provavelmente subclínicas, das encontradas no dia +100. Provavelmente, um número maior e mais uniforme de espécimes obtidos nesses dois períodos avaliatórios, possam demonstrar alterações histológicas iniciais que possam ter um valor preditivo precoce para a GVHDc, não retirando assim, o valor da continuidade desse exame no dia protocolar.

A incidência de GVHD crônica em nosso trabalho, diagnosticada no dia +100 foi de 9/45 pacientes (20% do total). Trata-se de uma média menor que a da literatura (entre 30 a 40% dos casos – WAGNER *et al.*, 1998). Entretanto, esse índice aumentou após a segunda avaliação (25/45 – 57,7%) realizada com um intervalo de tempo mediano de 195 dias (104-304 dias). Esta segunda avaliação se deveu ao aparecimento de sinais clínicos sugestivos de GVHDc. A literatura demonstra que o diagnóstico da síndrome crônica normalmente é feita numa mediana superior a 100 dias pós-TMO. NAKAMURA *et al.*, (1996), descreve uma mediana de 144 dias no diagnóstico da síndrome, KIROKI *et al.*, (1994 e 1996), 120 dias, BARRET *et al.*, (1984) em observação num período de 67 a 440 dias pós TMO, encontrou uma mediana de 220 para o

aparecimento da GVHDc, enquanto OCHS *et al.*, (1994), de 4 a 50 meses após o TMO, até mesmo para aqueles que receberam células-tronco através de aférese, como descreve MIFLIN *et al.*, (1997), num período superior a 180 dias. Nos pacientes do nosso serviço o tempo mínimo para diagnóstico inicial da síndrome foi de 104 e o máximo de 304 dias pós TMO.

Os fatores de risco ao desenvolvimento da GVHD crônica foram bem descritos na literatura. DICKE, 1994, estudando os efeitos tardios do TMO alogênico em 35000 pacientes através dos registros do International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) descreveu a possibilidade de desenvolvimento da GVHD crônica até 3 anos pós TMO de 46+/- 3%, sendo o fator mais importante, a doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda pregressa, aumentando a probabilidade de gravidade da forma crônica, dependendo do grau de acometimento da anterior. A idade do paciente, assim como as células-tronco terem sido obtidas de mulheres aloimunizadas em receptores masculinos vinham em seguida como fatores predisponentes para a GVHD crônica. OCHS *et al.*, 1994, descreveu, além dos fatores acima citados, a sorologia positiva do doador assim como do receptor para o citomegalovírus (CMV). Em nosso estudo, o sexo do doador (feminino) foi um dos fatores preditivos significativos para o desenvolvimento da GVHDc no dia +100, apesar dos dados não serem estratificados, entre as diferenças sexuais entre doador-receptor, devido ao pequeno número de pacientes analisados.

MIFLIN *et al.*, 1997, não observou importância quanto ao do tipo de coleta de células progenitoras na incidência da GVHD crônica, mas VIGORITO *et al.*, (1998), em recente avaliação, descreveu a possibilidade de maior desenvolvimento da forma crônica naqueles pacientes que receberam enxerto oriundo de coleta por aférese. Os resultados do nosso trabalho, apesar do número desigual entre os pacientes dos dois grupos (MO e CPP) e por não representar um estudo aleatório, sugerem que o desenvolvimento posterior da GVHD crônica possa estar vinculado ao tipo de coleta realizado (CPP - $p=0,023$).

Assim também, em avaliação realizada no dia +100, a precedência da GVHD aguda foi de importância como fator preditivo para a GVHD crônica, com um $p=0,0016$, indendentemente do grau de acometimento da mesma.

A maior idade do paciente tem sido motivo de discussão na literatura, implicando em pior prognóstico (sobrevida) e maior incidência da GVHD crônica (RAPOPORT *et al.*, 1995). Os pacientes submetidos ao TMO em nosso trabalho possuíam no momento do transplante, uma idade mediana de 36 anos (4-57 anos) mas que não demonstrou qualquer interrelação com o desenvolvimento de GVHDc, provavelmente devido ao grande intervalo de idade entre os pacientes. OCHS *et al.*, 1994, demonstrou que pacientes com idade superior a 18 anos, possuem um risco de $31\pm 12\%$ de desenvolver a GVHDc, mesmo sem acometimento prévio pela fase aguda. Já em pacientes pediátricos, a maior idade do doador, assim como o sexo (feminino) do doador estão associados à maior incidência da GVHD crônica (EISNER *et al.*, 1995).

A sobrevida dos pacientes está correlacionada basicamente à doença de base, seu estágio no momento do transplante e ao regime de condicionamento e de profilaxia para GVHD (REITER *et al.*, 1997). O sexo do doador, ou seja, medulas de mulheres enxertadas em homens, também tem sido motivo de discussão na literatura, como sinal de pior prognóstico para a sobrevida (ELFENBEIN *et al.*, 1983). ENRIGHT *et al.*, 1996, em análise multivariada, em pacientes com LMC em estágio precoce (< 1 ano de diagnóstico) ressalta que o transplante de células tronco provenientes de doadoras e enxertadas em pacientes masculinos, resultam num maior risco de recaídas ou morte ($p=0,002$).

Nossos resultados, em relação ao sexo do doador, não foram estatisticamente significativos. Mas interessante notar que, nos pacientes rebiopsiados (posterior ao dia +100), 15 receberam enxertos de mulheres e desses, 12 desenvolveram GVHDc extensa e 1 localizado. Desse 12, oito pacientes morreram sendo que 5 desses, devido a complicações sistêmicas da GVHDc. Dos que

receberam enxertos de doadores masculinos (10 pacientes) 6 desenvolveram GVHDc extenso e 3 localizado, sendo que desse grupo, 2 pacientes morreram em decorrência da GVHDc.

Já em análise univariada para a sobrevida, o nível sérico mediano de ciclosporina obteve uma importância estatisticamente significativa ($p=0,003$), enquanto que em análise multivariada, o tipo de transplante realizado ($p=0,02$) demonstrou ser um importante fator na sobrevida dos pacientes. Já os achados do exame histológico de mucosa bucal ($p=0,01$) e glândula salivar ($p=0,05$) demonstraram ter importância significativa na sobrevida dos pacientes, refletindo assim num pior prognóstico para aqueles com Graus mais avançados.

O tipo de coleta de células também foi preditivo de sobrevida em nosso estudo VIGORITO *et al.*, 1998 ressaltou o maior acometimento de GVHD crônica em pacientes transplantados com células coletadas em sangue periférico. Como já foi dito anteriormente, os grupos por nós estudados de MO e CPP não foram aleatórios de maneira que nossos resultados apenas sugerem forte tendência de que o transplante realizado através de aférese associa-se a maior mortalidade ($p=0,017$), podendo esta estar correlacionada ao maior índice de GVHD crônica encontrado nesses pacientes, ($p=0,02$) em relação à coleta da medula óssea.

Outros fatores discutidos em relação à mortalidade dos pacientes submetidos ao TMO alogênicos eram o tipo de GVHD crônica, se extensa, progressiva ou *de novo*, além da plaquetopenia e a disparidade HLA. SULLIVAN *et al.*, (1990) em estudo multivariado com 143 pacientes demonstrou que os fatores de risco independentes para mortalidade incluíam o tipo progressivo da doença, o estágio inicial da doença de base, e a plaquetopenia. Em estudo realizado por WINGARD *et al.*, 1989 em 85 pacientes, foram relacionados à mortalidade, além dos fatores já citados, as lesões liquenóides da pele e o aumento do nível de bilirrubina sérica.

Nos pacientes estudados, houve 11 (44%) óbitos, sendo que a maior causa de morte (7/11) foi relacionada à GVHD crônica extensa, estabelecida basicamente por características clínicas

(somente 1 caso com autópsia). Três (3) pacientes apresentaram recaída e em 1 paciente a morte não estava correlacionada ao TMO.

O nível plaquetário durante os dois períodos avaliatórios não foi estatisticamente relevante quanto à sobrevida dos pacientes, provavelmente devido à mediana plaquetária de $102 \times 10^3/l$ de sangue ($4,0-271 \times 10^3/l$ de sangue) encontrada no dia +100 e de $124 \times 10^3/l$ de sangue ($20-258 \times 10^3/l$ de sangue) na segunda avaliação. Por outro lado, o nível sérico de ciclosporina, calculado da mesma forma que para as plaquetas (regressão de univariada de COX-MANTELL), demonstrou ser importante na sobrevida dos pacientes ($p=0,0031$).

O estudo do valor prognóstico (sobrevida) dos achados histológicos em pele, mucosa bucal e glândula salivar mostraram resultados interessantes. A literatura ressalta a importância da extensão da GVHD crônica (CHIU *et al.*, 1995), na sobrevida e o valor diagnóstico das biópsias realizadas como “*screening*” para a síndrome (LERNER *et al.*, 1974). Tanto a análise histológica da mucosa bucal ($p=0,020$ e em análise binarizada, $p=0,01$) como da glândula salivar ($p=0,009$ e quando binarizada, $0,027$) apresentaram resultados associados à sobrevida dos pacientes, refletindo com grande especificidade e sensibilidade o grau de agressão da doença.

Dificuldades do Trabalho

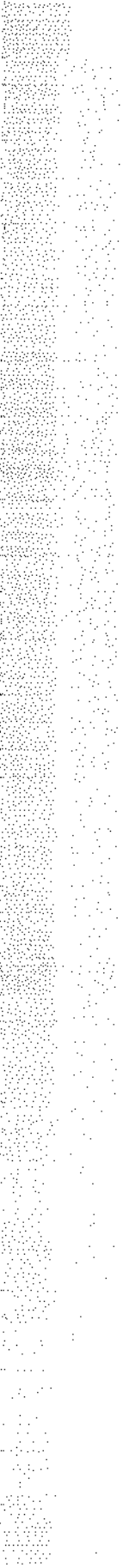
Esse trabalho foi idealizado a partir de observações clínicas nos pacientes transplantados em nosso serviço e os dados foram coletados de maneira protocolar. Inicialmente, pela falta de experiência, algumas biópsias não foram representativas e muitas glândulas salivares não foram coletadas de maneira correta. A biópsia protocolar realizada ao redor do dia +100 é feita em todos os pacientes. Uma nova biópsia naqueles pacientes que não apresentavam GVHD crônico (para controle das biópsias positivas nos pacientes do mesmo período) não foi coletada por não ter sido anteriormente informada aos pacientes. Portanto, não seria ético repeti-las.

O número de pacientes que compuseram o estudo foi pequeno e não uniforme, principalmente no segundo período, onde havia a presença da GVHD crônica. Isso certamente altera a força estatística do trabalho, principalmente quando correlacionamos os achados de mucosa bucal e glândula salivar com sobrevida. O próximo passo a ser dado será o levantamento de todas as biópsias realizadas, aumentando assim o número de amostras e realizar novamente os testes para comprovação dos nossos achados.

Conclusões

Apesar do pequeno número de pacientes analisados, os resultados do nosso trabalho sugerem que:

1. Os diagnósticos clínico e histológico da GVHD crônica só foram estabelecidos num período tardio ao dia +100.
2. A glândula salivar revela com maior frequência a agressão linfocitária da GVHD crônica que a mucosa bucal e a pele.
3. GVHD aguda pregressa, assim como doadoras femininas para receptores masculinos e o tipo de transplante realizado demonstraram ser fatores importantes na sobrevida dos pacientes.
4. A GVHD aguda, assim como o tipo de transplante (CTP), e o sexo do doador demonstraram ser importantes fatores preditivos desenvolvimento da GVHD crônica.
5. O acometimento em glândula salivar, juntamente com a mucosa bucal na GVHD crônica, nos graus histológicos crescentes pode se associar a sobrevida menor.
6. Um número maior de pacientes deve ser estudado, no sentido de se estabelecer com maior segurança os resultados acima, principalmente em relação à correlação entre os achados histológicos e à sobrevida dos pacientes.



Referências Bibliográficas

- ADAM BA, ISMALI R, SIVANESAN S. Busulfan hyperpigmentation.. Light and electron microscopic studies. *J Dermatol* 1980; 7: 405-411.
- AKOSA AB & LAMPERT IA. Sweat gland abnormalities in lichenoid dermatosis. *Histopathology* 1991; 19: 345-349.
- AKOSA AB, LAMPERT IA. The sweat gland in graft-versus-host disease. *J Pathol* 1990, 161: 261-266.
- ALBERT ED, ERICKSON VM, GRAHAM TC. Serology and genetics of the DL-A system. Establishment of specificities. *Tissue Antigens* 1973; 3: 417-430.
- AMOS TA & GORDON MY. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation – a review. *Cell Transplant* 1995; 4: 547-569.
- ANASETTI C, RYBKA W, SULLIVAN KM *et al*. Graft versus host disease is associated with autoimmune-like thrombocytopenia. *Blood* 1989; 73: 1054-1058.
- ARIAS D, REQUENA L, HASSON A *et al*. Localized epidermal necrolysis (erythema multiforme-like reaction) following intravenous injection of vinblastine. *J Cutan Patol* 1991; 18:344-346.
- ASCHAN J. Treatment of moderate to severe acute graft-versus-host disease: a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantation* 1994; 14: 601-607.
- ATKINSON K, FARREL C, CHAPMAN G, DOWNS K, PENNY R, BIGGS J. Female donors increase the risk of graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 1986; 63: 231-239.
- ATKINSON K. Chronic graft-versus-host disease (review). *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 69-82.
- ATKINSON K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1990; 5:209-226.
- BACH FH & VANROOD JJ (A). The major histocompatibility complex – genetics and biology. *N Engl J Med* 1976; 295: 806-813.
- BACH FH & VANROOD JJ (B). The major histocompatibility complex – genetics and biology. *N Engl J Med* 1976; 295: 872-878.

- BACH FH & VANROOD JJ (C). The major histocompatibility complex – genetics and biology. *N Engl J Med* 1976; **295**: 927-936.
- BANDINI G, BELARDINELLI A, ROSTI G, CALORI E, MOTTA MR, RIZZI S, BENINI C, TURA S. Toxicity of high-dose busulphan and cyclophosphamide as conditioning therapy for allogeneic bone marrow transplantation in adults with haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.*, 1994; **13**:577-581.
- BARRET AP, BILOUS AM. Oral patterns of acute and chronic graft-versus-host disease. *Arch Dermatol* 1984; **120**: 1461-1465.
- BERSCHORNER WE, YARDLEY JH, TUTUSCHKA PJ, SANTOS GW. Deficiency of intestinal immunity with graft-versus-host disease in humans. *J Infect Dis* 1981; **144**: 38-46.
- BILLIGHAM RE. The biology of graft-versus-host reaction. *Harvey Lecture* 1966-1967; **62**:21-78.
- BOLGER GB, SULLIVAN KM, SPENCER AM *et al*. Myasthenia gravis after allogeneic bone marrow transplantation: relationship to chronic graft-versus-host disease. *Neurology* 1986; **36**: 1087-1091.
- BOMBI JÁ, PALOU J, BRUGUERA M, FELIU E, MARTIN-ORTEGA E, ROZMAN C, CARDESA A. Pathology of Bone Marrow Transplantation. *Seminars Diagn Pathol* 1992; **9**(3): 220-231.
- BORTIN M. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970; **9**: 571-587.
- BOTTOMLEY WK, PERLIN E, ROSS RG. Antineoplastic agents and their oral manifestation. *Oral Med* 1977; **Oct**: 527-534.
- BRONNER AK, HOOD AF. Cutaneous complications of chemotherapeutic agents. *J Am Acad Dermatol* 1983; **9**: 645-663.
- BUGDORF WH, GILMORE WA, GANICK RG. Peculiar acral erythema secondary to high-dose chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Ann intern Med* 1982; **97**:61-62.
- BURDON J, BELL R, SULLIVAN J, HENDERSON M. Adriamycin-induced recall phenomenon 15 years after radiotherapy. *JAMA* 1978; **239**: 931.

- CARLENS S, RIGDÉN O, REMBERGER M *et al*. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single center analysis. *Bone Marrow Transpl* 1998; **22**: 755-761.
- CHAUSHU G, CHAUSHU-ITZKOVITZ S, YEFENOF E *et al*. A longitudinal follow-up of salivary secretion in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; **79**: 164-169.
- CHIU EKW, HAWKINS BR, LIANG RHS, LIE AKW, KWONG YL, CHAN TK. Incidence of graft-versus-host disease in Hong Kong Chinese and its influence on survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 543-547.
- CORSON SL, SULLIVAN K, BATZER F, AUGUST C, STORB R, THOMAS ED. Gynecologic manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Obstet Gynecol* 1982; **60**: 488-492.
- COX GL, ROBERTSON DB. Toxic erythema of palms and soles associated with high-dose mercaptopurine chemotherapy. *Arch Dermatol* 1986; **122**:1413-1414.
- CURTIS JW, CAUGHMAN GB, AUGUSTA GA. An apparent unusual relationship between rampant caries and the oral mucosal manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; **78**: 267-272.
- DEEG HJ & HENSLEE-DOWNEY PJ. Management of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 1990; **6**: 1-8.
- DENS F, BOOGAERTS M, BOUTE P *et al*. Caries-related salivary microorganisms and salivary flow rate in bone marrow recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; **81**: 38-43.
- DICKE KA. Late effects after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; **14**(suplem 4): S11-S13.
- DOYLE LA, BERG C, BOTTINO G, CHABNER B. Erythema and desquamation after high-dose methotrexate. *Ann Intern Med* 1983; **98**: 611-612.
- DUNAGIN WG. Dermatologic toxicity. In Perry MG, Yarbrow JW, eds. *Toxicity of Chemotherapy*. Orlando: Grune na Stratton, Inc., 1984; pp.: 125-154.

- EISNER MD & AUGUST CS. Impact of donor and recipient characteristics on the development of acute and chronic graft-versus-host disease following pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 663-668.
- ELKINS WL. Cellular immunology and the pathogenesis of graft-versus-host reactions. *Prog Allergy* 1971; **15**: 78-187.
- ENRIGHT H, DANIELS K, ARTHUR DC *et al*. Related donor marrow transplant for chronic myeloid leukemia: patient characteristics predictive of outcome. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**: 537-542.
- EPSTEIN JB & TRUELOVE EL. Topical cyclosporine in a bioadhesive for treatment of oral lichenoid mucosal reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; **82**: 532-536.
- EPSTEIN JB, SHERLOCK CH, WOLBER RA. Hairy leukoplakia after bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; **75**: 690-695.
- FELDMAN LD, AJANI JÁ. Fluorouracil-associated dermatitis of the hands and feet. *JAMA* 1985; **254**:3479.
- FERRARA JLM, DEEG HJ. Graft-versus-host disease. *The New England J Med* 1991; **324** (10): 667-674.
- FIRST LR, SMITH BR, LIPTON J, NATHAN EG, PARLMAN R, RAPPEPORT JM. Isolated thrombocytopenia after allogeneic bone marrow transplantation: existence of transient and chronic thrombocytopenic syndromes. *Blood* 1985; **65**: 368-374.
- FITZPATRICK JE. The cutaneous histopathology of chemotherapeutic reactions. *J Cutan Pathol*, 1993; **20**:1-14.
- FLETCHER RH, FLETCHER SW, WAGNER EH. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. 3ª edição. Artes Médicas, Porto alegre, 1996.
- FRANKLIN R, KENYON KR, TUTSHKA PJ, SARAL R, GREEN WWR, SANTOS GW. Occular manifestation of graft-versus-host disease. *Am Acad Ophthalmol* 1983; **90**: 4-13.
- GOOD RA, DALMASSO AP, MARTINEZ C, ARCHER OK, PIERCE JC, PAPERMASTER BW. The role of thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J Exp Med* 1962; **116**:773-796.

- GRATWOHL AA, MATSOPOULOS HM, CHUSED TM *et al.* Sjögren-type syndrome after allogeneic bone-marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1977; **87**: 703-706.
- GREESPAN D, GREESPAN JS, De SOUZA YG *et al.* Oral hairy leukoplakia in na HIV-negative renal transplant recipient. *J Oral Pathol Med* 1989; **18**: 32-34.
- GUGGENHEIMER J. Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. *Oral Surg* 1977; **44**: 58-63.
- HERZIG RH, WOLF SN, LAZRUS HM, PHILLIPS GL, KARANES PC, HERZIG GP. High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukemia. *Blood* 1983; **62**: 361-369.
- HIROKI A, NAKAMURA S, SHINOHARA M *et al.* A comparison of glandular involvement between chronic graft-versus-host disease and Sjögren's syndrome. In *J oral Maxillofacial Surg* 1996; **25**: 298-307.
- HIROKI A, NAKAMURA S, SHINOHARA M, OKA M. Significance of oral examination in chronic graft versus-host-disease. *Oral Pathol Med* 1994; **23**:209-215.
- HORN TD, ZAHURAK ML, ATKINS D *et al.* Lichen planus-like histopathologic characteristics in the cutaneous graft-versus-host reaction. Prognostic significance independent of time course after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1997; **133**(8): 1033-1036.
- HORN TD. The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1995; **13**(8): 965-5.
- HRUSHESKY WJ. Serpentine supravenuous fluorouracil hyperpigmentation. *JAMA* 1976; **236**:138.
- HYMES SR, SIMONTON SC, FARMER ER, BESCHORNER WB, TUTSCHKA PPJ, SANTOS GW. Cutaneous busulfan effect in patients receiving bone marrow transplantation. *J Cutan Pathol*, 1985; **12**: 125-129.
- ITIN PH. Oral hairy leucoplakia – 10 years on. *Dermatology* 1993; **187**: 159-163.
- JACOBSON LO, SIMMINS EL, MARKS EK, ELDREDGE JH. Recovery from irradiation injury. *Science*, 1951; **113**:510-511
- JANIN-MERCIER A, VALADES S, BOCCON-GIBBOD L *et al.* Pulmonary lesions following bone marrow graft. Study of 35 cases. *Ann Pathol* 1985; **5**: 183-184.

- KENNEDY BJ, ROBERT L, GOLTZ W. Skin changes secondary to hydroxyurea therapy. *Arch Dermatol* 1975; **111**: 183-187.
- KING GN, HEALY CM, GLOVER MT et al. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; **78**: 718-726.
- KOEHN GG, BALIZER LB. Unusual local cutaneous reaction to decarbazine. *Arch Dermatol* 1982; **11**: 1018-1019.
- KORROSSY KS, HOOD AF. Methotrexate reactivation of sunburn reaction. *Arch Dermatol* 1981; **117**: 310-311.
- LACKHART PB, SONIS ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. *J Dermatol Surg and Oncol* 1981; **7**: 1019-1025.
- LAMPERT IA, JANOSSY G, SUTTERS AJ et al. Immunological analysis of the skin in graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 1982; **50**: 59-72.
- LAWLEY TJ, PECK GL, MOUTSOPOULOS HM et al. Scleroderm Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977; **87**: 707-709.
- LERNER KG, KAO GF, STORB R, BUCKNER CD, CLIFT A, THOMAS ED. Histopathology of graft-versus-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplant Proceed* 1974; **4**(4): 367-371.
- LEVINE LE, MEDENICA MM, LORINCZ AL, SOLTANI K, RAAB B. Distinctive acral erythema occurring during therapy for severe myelogenous leukemia. *Arch Dermatol* 1985; **121**: 102-104.
- LORENZ E, UPHOFF D, REID TR, SHELTON E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; **12**: 197-201.
- MARKS JE, DAVIS CC, GOTTSMAN VL et al. The effects of radiation on parotid salivary function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; **7**: 1013-1019.
- MARTIN P. Overview of marrow transplantation immunology. In Forman SJ, Blume KG, Thomas ED eds; *Bone Marrow Transplantation*; Seattle, Washington, pp:16-21; 1994.

- MATHÉ G., SCHWARZENBERG L., AMIEL JL. Immunogenetic and immunologic problems of allogeneic haematopoietic radio-chimeras in man. *Scandinavian Journal of Haematology*, 1967; **4**:193-216.
- MATSUE K, LUM LG, WITHERSPOON RP, STORB R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T cell-derived factors. *Blood* 1984; **69**: 308-315.
- McGUIRE DB, ALTOMONTE V, PETERSON DE, WINGARD JR, JONES RJ, GRACHOW LB. Patterns of mucositis and pain in patients receiving preparative chemotherapy and bone marrow transplantation. *Oncology Nursing Forum* 1993; **20**(10): 1493-1502.
- METZE K. Methodological problems of grading tumour regression: responders compared to non-responders. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; **124**: 281-212.
- MIFLIN G, RUSSELL NH, HUTCHINSON RM, MORGAN G et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for haematological malignancies – annalysis of kinetics of engraftment and GVHD risk. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 9-13.
- MURPHY GF, LAVKER RM, WHITAKER D, KORNGOLD R. Cytotoxic folliculitis in GvHD – evidence of follicular stem cell injury and recovery. *J Cutan Pathol* 1990; **18**:309-314.
- NAKAMURA S, HIROKI A, SHINOHARA M *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**: 556-563.
- NAKLEH RE, MILLER W, SNOVER DC. Significance of mucosal vs salivary gland changes in lip biopsies in the diagnosis of chronic-vs-host disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989; **113**: 932-934.
- NORHAGEN G, ENGSTRÖM E, BJÖRKSTRAND B, HAMMARSTRÖM L, SMITH CIE, RINGDÉN O . Salivary and serum immunoglobulins in recipients of transplanted allogeneic and autologous bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1994; **14**: 229-234.
- OCHS LA, MILLER WJ, FILIPOVICH AH et al. Predictive factors of death from chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow tranplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; **13**: 455-460.

- OTSUBO H, YOKOE H, MIYA T *et al.* Gingival squamous cell carcinoma in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84: 171-174.
- PECK GL, HERZIG GP, ELIAS PM. Toxic epidermal necrolysis in a patient with graft-versus-host reaction. *Arch Derm* 1972; 105: 561-569.
- PERREAULT C, COUSINEAU S, D'ANGELO G *et al.* Lymphoid interstitial pneumonia after allogeneic bone marrow transplantation. A possible manifestation of chronic graft-versus-host disease. *Cancer* 1985; 55: 1-9.
- PETERSON DE. Toxicity of chemotherapy in oral lesions. In.. Perry MC, Yarbrow JW, eds. *Toxicity of Chemotherapy*. Orlando, Fla.. Grune & Stratton, 1984; pp: 155-180.
- RAMSDELL F, LANTZ T, FOWLKES BV. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 1989; 246: 1038-1041.
- RAPOPORT AP, DiPERSIO JF, MARTIN BA *et al.* Patients > age 40 years undergoing autologous or allogeneic BMT have regimen-related mortality rates and event-free survivals comparable to < age 40 years. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 523-430.
- RAPPEPORT J, REINHERZ E, MIHM M, LOPANSKI S, PARKMAN E. Acute graft-versus-host disease in recipients of bone marrow transplants from identical twin donors. *Lancet* 1979; 2: 717-720.
- REITER E, KEIL F, BRUGGER S, KALH P *et al.* Excellent long-term survival after allogeneic marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 1191-1196.
- ROCA J, GRANENA A, RODRIGUEZ-ROISIN R, ALVAREZ P, AGUSTI-VIDAL A, ROZMAN C. Fatal airway disease in an adult with chronic graft-versus-host disease. *Thorax* 1982; 37: 77-78.
- ROVELLI A, ARRIGO C, NESI F, BALDUZZI A *et al.* The role of thalidomide in the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease following bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 577-581.
- SALE GE. Are the stem cells attacked in graft-versus-host disease? *J Cutan Pathol* 1990; 18: 305-306.

- SALE GE. The sicca syndrome of GVHD in Sale Ge, Shulman HM (eds): *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York, NY, Masson, 1984, pg 136-155.
- SANTOS GW, TUTSCHKA PJ, BROOKMEYER R *et al*. Marrow transplantation for acute non lymphocytic leukemia after treatment with bussulfan and cyclophosphamide. *New England J Med* 1983; **309**: 1347-1353.
- SANTOS GW. History of bone marrow transplantation. *Clin Haematol* 1983; **12**: 611-639.
- SHKLAR G. The effects of aging upon oral mucosa. *J Invest. Dermatol* 1966; **47**: 115-119.
- SHULMAN HM & McDONALD GB. Liver disease after bone marrow transplantation. In Sale Ge, Shulman HM (eds): *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York, NY, Masson, 1984, pg 104-135.
- SHULMAN HM, SALE GE: Pathology of acute and chronic cutaneous GVHD, in Sale Ge, Shulman HM (eds): *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York, NY, Masson, 1984, pg 40-76.
- SHULMAN HM, SULLIVAN KM, WEIDEN PL *et al*. Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980; **69**: 204-217.
- SILVER FS, ESPINOZA LR, HARTMANN RC. Acral arythema and hydroxyurea. *Ann Intern Med* 1983; **98**:675.
- SIMON R, ALTMAN DG. Statistical aspects of prognostics factor studies in oncology. *Br J Cancer*, 1994, **69**: 979-985.
- SNOVER DC, WEISDORF AS, RAMSAY NK, McGLAVE P, KERSEY J. Hepatic graft-versus-host disease: a study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology* 1984; **4**: 123-130.
- SONIS ST, AL LIEBERMAN. Oral complications in patients receiving treatment for malignancies other than of the head and neck. *J Am Dent Assoc* 1978; **97**:469-472.
- SONIS ST, TRACEY C, SHKLAR G, JENSON J, FLORINE D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; **69**: 437-443.
- SPENCER JH. Local erythema multiforme-like drug reaction following intavenous mitomycin C and 5-fluorouracil. *J Surg Oncol* 1984; **26**: 47-50.

- STORB R, DEEG HJ. Failure of allogeneic canine marrow grafts after total body irradiation: allogeneic "resistance" vs transfusion induced sensitization. *Transplantation* 1986; **42**: 571-580.
- STORB R, EPSTEIN RB, RUDOLPH RH, THOMAS ED. Allogeneic canine bone marrow transplantation following cyclophosphamide. *Transplantation* 1969; **7**: 378-386.
- STORB R, PRENTICE R, THOMAS ED. Treatment of aplastic anemia by marrow transplantation from HLA identical siblings. Prognostic factors associated with graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1977; **59**: 625.
- STORB R, THOMAS ED, BUCKNER CD *et al*. Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia: a follow-up on long term survivors. *Blood* 1976; **48**: 485-490.
- STORB R, THOMAS ED. The scientific foundation of marrow transplantation based on animal studies *In*.. Stephen J Forman, Blume KG, Thomas ED, eds Bone Marrow Transplantation. Boston. Braun-Brumfield, Inc., 1994; pp: 3-11.
- STORB R. Prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Transplant Proceed* 1995; **5**: 2653-2656.
- STORB R, WEIDEN PL, GRAHAM TC, LERNER KG, NELSONN, THOMAS ED. Hemopoietic grafts between DLA-identical canine littermates following dimethyl myleran. Evidence for resistance in grafts not associated with DLA and obrigated by antithymocyte serum. *Transplantation* 1987; **24**: 349-357.
- SULLIVAN KM, SHULMAN HM, STORB R *et al*. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunossupression. *Blood* 1990; **57**: 267-276.
- SULLIVAN KM. Graft versus host disease. *In* Forman SJ, Blume KG, Thomas ED (eds): Bone Marrow Transplantation. Cambridge, Massachusetts, Blackwell Scientific Publications, 1994, pg 339-362.
- SVILAND L, SALE GE, MYERSON D. Endothelial changes in cutaneous graft-versus-host disease: a comparison between HLA matched and mismatched recipients of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl* 1991, **7**: 35-38.

- TAKATA M, IMAI T, HIRONE T. Immunoelectron microscopy of acute graft versus host disease of the skin after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol* 1993; **46**: 801-805.
- THEIN SL, GOLDMAN JM, GALTON DA. Acute graft-versus-host disease after autografting for chronic granulocytic leukemia in transplantation. *Ann Intern Med* 1981; **94**: 210-211.
- THOMAS ED, STORB R, CLIFT RA, FEFER A, HOHNSON FL, NEIMAN PE, LERNER KG, GLUCKSBERG H, BUCKNER CD (A). Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; **292**: 832-843.
- THOMAS ED, STORB R, CLIFT RA, FEFER A, HOHNSON FL, NEIMAN PE, LERNER KG, GLUCKSBERG H, BUCKNER CD (B). Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; **292**: 895-902.
- THOMAS ED, STORB R, CLIFT TA, FEFER A, HOHNSON FL, NEIMAN PE, LERNER KG, GLUCKSBERG H, BUCKNER CD. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 1975; **292**:832-843
- TSOI M-S, STORB R, JONES E *et al*. Deposition of IgM and complement at the dermo-epidermal junction in acute and chronic graft-versus-host disease in man. *J Immunol* 1978; **120**: 1485-1492.
- TUTSCHKA PJ, COPELAN EA, KLEIN JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 1987; **70**: 1382-1388.
- URBANO-MARQUEZ A, ESTRUCH R, GRAU JM *et al*. Inflammatory myopathy associated with chronic graft-versus-host disease. *Neurology* 1986; **36**:1091-1093.
- VanBEKKUM DW & E DE VRIES MJ. Radiation chimaeras. Radiobiological Institute of the Organization for Health Research YNO, Rijswijk ZH Netherlands. *Academic Press* 1967; New York.
- VIGORITO AC, AZEVEDO WM, MARQUES JFC, AZEVEDO AM, EID K, ARANHA FJP, LORAN-METZE I, OLIVEIRA G, CORREA MEP, REIS ARC, MIRANDA EC, SOUZA CA. A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitors cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transpl* 1998; **22**: 0-0.

- WAGNER JL, FLOWERS MED, LONGTON G, STORB R, SCHUBERT M, SULLIVAN KM. The development of chronic graft-versus-host disease: an analysis of screening studies and the impact of corticosteroid use at 100 days after transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1998; **22**: 139-146.
- WERNER Y, TORNBERG B. Cutaneous side effects of bleomycin therapy. *Acta Derm Venereol* 1976; **56**: 155-158.
- WINGARD JR, PIANTADOSI S, VOLGELSANG GB *et al*. Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Blood* 1989; **74**: 1428-1435.
- YAU JC, leMAISTRE CF, ZAGARS GK *et al*. Methilprednidolone, cyclosporine and methotrexate for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.*, 1990; **5**: 269-272.
- YAU JC, ZANDER AR, SRIGLEY JR, *et al*. Chronic graft-versus-host disease complicated by micronodular cirrhosis and esophageal varices. *Transplant* 1986; **41**: 129-130.
- YOKEL BK, FIREDMAN KJ, FARMER ER, HOOD AF. Cutaneous pathology following toposide therapy. *J Cutan Pathol* 1987; **14**: 326-330.