



PATRICIA DO SOCORRO QUEIROZ FEIO

“ESTUDO DO PROTEOMA SALIVAR APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS”

PIRACICABA
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PATRICIA DO SOCORRO QUEIROZ FEIO

“ESTUDO DO PROTEOMA SALIVAR APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS”

Orientador: Prof. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTORA EM
ESTOMATOPATOLOGIA NA ÁREA DE
PATOLOGIA.**

Este exemplar corresponde à versão
final da Tese defendida pela aluna Patricia do Socorro Queiroz Feio,
e orientada pela Prof. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa

Assinatura do Orientador

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

F327e

Feio, Patrícia do Socorro Queiroz, 1982-
Estudo do proteoma salivar após transplante alogênico de
células tronco hematopoéticas / Patrícia do Socorro Queiroz Feio.
-- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Elvira Pizzigatti Corrêa.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Proteômica. 2. Transplante de medula óssea. 3. Doença
enxerto-hospedeiro. 4. Saliva. 5. Espectrometria de massas. I.
Corrêa, Maria Elvira Pizzigatti. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Salivary proteome analysis following allogeneic
hematopoietic stem cell transplantation

Palavras-chave em Inglês:

Proteomics

Bone marrow transplantation

Graft vs host disease

Saliva

Mass spectrometry

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Maria Elvira Pizzigatti Corrêa [Orientador]

Vanessa Rocha Lima Shcaira

Maria Leticia Cintra

Francisco José Penteado Aranha

Sandra Regina Torres

Data da defesa: 01-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 01 de Março de 2013, considerou a candidata PATRICIA DO SOCORRO QUEIROZ FEIO aprovada.

Profa. Dra. MARIA ELVIRA PIZZIGATTI CORRÊA

Profa. Dra. VANESSA ROCHA LIMA SHCAIRA

Profa. Dra. MARIA LETICIA CINTRA

Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ PENTEADO ARANHA

Profa. Dra. SANDRA REGINA TORRES

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir a conclusão de mais esta etapa importante da minha vida.

*Aos meus queridos pais, **Lourdes e Rui**, por todo amor, pela dedicação e pelos sacrifícios feitos para proporcionar o grande tesouro da educação.*

*À minha irmã e melhor amiga, **Cristiane**, sempre presente mesmo na distância. Obrigada pelo amor compartilhado e pela grande cumplicidade durante nossas vidas.*

*À minha querida avó, **Aracy** (in memoriam), pelo apoio e carinho único, principalmente, no início da minha etapa profissional.*

*Aos **pacientes submetidos ao transplante de medula óssea**, que reforçaram em mim o valor da vida!*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

Ao **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES** pela concessão de bolsa de estudos;

Aos **Profs. Drs. Alan dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Ao **Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza**, Professor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e Coordenador do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Unicamp, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho;

Ao **Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)** e sua coordenadora **Dra. Adriana Paes Leme**, pela utilização dos equipamentos e estruturas fundamentais para realização deste trabalho;

Ao **Dr. Richard Presland, Associate Professor & Graduate Program Director Oral Health Sciences, University of Washington, Seattle, USA** pelo auxílio essencial na interpretação dos dados deste trabalho;

À **Prof. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa**, por permitir a realização deste trabalho, pela amizade e por proporcionar o convívio com pacientes tão especiais;

À **Dra. Vanessa Shcaira**, pelos momentos de aprendizados e conversas divididos neste último ano no ambulatório de Odontologia do HEMOCENTRO;

Ao **Prof. Márcio Ajudarte Lopes**, pela confiança e oportunidades nesses anos de doutorado;

Aos **médicos, enfermeiros e funcionários do Hemocentro e do ambulatório de Transplante de Medula Óssea**, pelo convívio e apoio ao desenvolvimento deste trabalho;

À amiga **Andréia Aparecida da Silva**, que conheci ainda no mestrado e após alguns anos a vida trouxe para trabalhar comigo. Obrigada pela grande colaboração neste trabalho e pelas conversas amigáveis;

Aos colegas **Marcos Alborghetti e Camila Boer**, pela contribuição para realização deste trabalho;

Aos amigos que encontrei durante meus longos 7 anos de pós-graduação em São Paulo e agora também distantes: **Daniel Berretta, Débora Bastos, Jorge Esquiche Leon, Renato Hopp, Lays Sobral e Angélica Bonacci**. As duas últimas agradeço em especial, pelo acolhimento e inclusão nas suas famílias;

Aos amigos e companheiros de Orocentro: **Erika Graf, Isadora Flores, Karen Graner, Marisol Martinez, Marcondes Sena, Renato Hopp, Sabrina Nogueira, Rogério Gondak, Wilfredo Arriagada**. Obrigada pela oportunidade de aprendermos sempre juntos e pelos momentos descontraídos durante as quintas dos últimos 3 anos;

As pessoas que fizeram ou fazem parte deste lugar especial que é o Orocentro: **Cida, Daniele, Elisabete, Jeane, Rogério Elias e Valéria Totti**;

*Aos demais amigos do programa de pós-graduação em Estomatopatologia: **Alicia Piña, Ana Camila Messetti, Fernanda Moreira, Bruno de Andrade, Camilla Gomes, Daniel Berretta, Elizabete Bagordakis, Felipe Fonseca, Harim dos Santos, José Sabino Jr., José Laurentino Ferreira Filho, Juscelino Jardim, Karina Faria, Lara Ramos Innocentini, Lucas Teixeira, Luciana de Almeida, Marianne Carvalho, Nathalia Lima, Priscila Rodrigues, Rodrigo Silva, Wagner da Silva, Sabrina Nogueira, Sibeles de Aquino, Victor Toral Rizo**; Agradeço em especial às amigas: **Rose Ortega, Katya Diaz, Andreia Bufalino e Marisol Martinez** pela amizade;*

*Ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva** e **Prof. Dr. Fabricio Tuji** da Universidade Federal do Pará (UFPA) por acreditarem em mim ainda no princípio da vida acadêmica;*

*Aos amigos de Belém, que apesar de distantes estavam sempre prontos para compartilhar os momentos felizes e as angústias: **Bruna, Brunno, Catarina, Cléber, Clívia, Liany, Victor, Natasha e Manuela**.*

*À prima **Cecília e seu marido Paulo**, pelos momentos de convívio em família proporcionados em São Paulo;*

*Aos amigos “paraenses de Piracicaba”: **Armando, Camila, Lucas e Miki**. Obrigada pelo apoio de sempre e pela saudade dividida da nossa cidade;*

*Aos funcionários do laboratório de patologia: **Adriano, Fabiana, Geovania, Luana e João**;*

Por fim, muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho ou para minha construção profissional e pessoal!

EPÍGRAFE

*Não importa onde você parou,
em que momento da vida você cansou,
o que importa é que sempre é possível
e necessário "Recomeçar".*

Paulo Roberto Gaefke

RESUMO

Apesar dos avanços, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ainda é principal complicação pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (alo TCTH), que limita sobrevida e induz maior morbidade nos pacientes. A descoberta de proteínas diferentemente presentes na DECH pode ser capaz de tornar o diagnóstico mais precoce e preciso, além de permitir melhor tratamento. Neste contexto, o estudo dos proteomas busca encontrar proteínas que funcionem como biomarcadores e a utilização da saliva para este fim apresenta vantagens por apresentar coleta não invasiva, indolor e de baixo custo. O objetivo deste estudo foi o de avaliar prospectivamente o proteoma salivar em pacientes submetidos ao alo TCTH e comparar a perfil das proteínas em pacientes que desenvolveram a DECH (DECH+) e os que não desenvolveram (DECH-), elaborando um painel de potenciais biomarcadores para esta doença. Foram incluídos neste trabalho 20 pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Unicamp. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação odontológica e adequação do meio bucal quando necessário, além de serem avaliados para grau de mucosite, parâmetros clínicos de hipossalivação e avaliação das lesões orais de DECH. Foram coletadas amostras de saliva não estimulada em 3 períodos: pré-TCTH, no d+8-10 e d+ 80-100. Adicionalmente, foi avaliado o fluxo salivar dos pacientes em todas as coletas. Todas as amostras foram acondicionadas com inibidores de proteases para avaliação proteômica. A análise das amostras foi realizada por espectrometria de massas após digestão com tripsina e separação dos peptídeos por uma coluna reversa de nano-cromatografia líquida. Os dados obtidos foram confrontados com o banco *International Protein Index (IPI) human* utilizando o software *Mascot v.2.3.2.0*® e os arquivos resultantes da busca foram carregados no software *Scaffold*®. As proteínas que mostraram variação em razão de 100% ($\leq 0,5$ e >2) entre os grupos

DECH+ e DECH- no período d+8-10 para d+80-100 foram consideradas significativas. Não houve correlação estatisticamente significativa dos parâmetros clínicos de hipossalivação com o grupo DECH+. Entretanto na avaliação longitudinal dos pacientes, a presença de saliva espessa e viscosa mostrou-se significativa ($p = 0,003$). Foram identificadas 69 proteínas nos pacientes avaliados, sendo as mais frequentes relacionadas à defesa e imunidade. No presente estudo, dez proteínas mostraram alteração no grupo DECH+, porém 4 estavam presentes em apenas uma amostra com a doença. Portanto, as proteínas *Lactoferroxin-B*, *IGL@ protein*, *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B*, *Cystatin-SA*, *Cystatin-S* e *Prolactin-inducible protein* foram consideradas como potenciais biomarcadores para a doença do enxerto contra hospedeiro.

Palavras-chaves: proteômica; transplante de medula óssea; doença enxerto-hospedeiro; saliva; espectrometria de massas.

ABSTRACT

The graft-versus-host disease (GVHD) remains the major clinical complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), limiting survival and inducing major morbidity. Differently expressed proteins in GVHD have the potential of improving early and accurate diagnosis, also allow a better treatment. Proteome analysis is emerging for the discovery of proteins which function as biomarkers and saliva can be useful for this purpose because offers an easy, inexpensive, safe, and non-invasive approach. The aims of this study were to evaluate salivary proteome in patients underwent allo-HSCT and compare the proteins expressions between patients with and without GVHD and elaborate a panel of possible biomarkers for this condition. Twenty patients underwent allo-HSCT at the Bone Marrow Transplantation Unit - UNICAMP were enrolled in this study. Patients underwent dental evaluation before HSCT and oral environment stabilization were performed when necessary. Also, an evaluation of grade of mucositis, clinical signs of hyposalivation and oral GVHD lesions. Unstimulated saliva samples were collected on 3 different times: pre-HSCT, d+8-10 e d+ 80-100. Additionally, the unstimulated salivary flow rate was measured. Thus, these samples were stored with protease inhibitors for proteomic evaluation. The samples were analysed by mass spectrometry after protein digestion with trypsin and peptides separated by a Reverse Phase-nanoUltra Performance Liquid Chromatography. Protein search was performed using the Mascot v.2.3.2.0 ® engine against International Protein Index (IPI) human Database and the output files of the searches were loaded onto Scaffold software ®. The proteins which showed 100% fold change ($\leq 0,5$ e >2) between d+8-10 and d+80-100 were significant. There was no statistically significant correlation of clinical parameters of hyposalivation with GVHD+ group. However in the longitudinal assessment of patients, the presence of thick and viscous saliva was significant ($p = 0,003$). Sixty nine proteins were identified and the majority was involved in defense and

immunity. The results indicated ten proteins differentially expressed in GVHD+ group, but 4 were presented only in one sample with disease. Therefore, Lactoferrin-B, IGL @ protein, Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B, Cystatin SA, Cystatin-S and Prolactin-inducible protein were identified as potential biomarkers for graft-versus-host disease.

key-words: Proteomics; Bone Marrow Transplantation; Graft vs Host Disease; saliva; Mass Spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG: anemia aplástica grave

AF: anemia falciforme

Alo TCTH: transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

BO: bronquiolite obliterante

BSA: Bovine serum albumin

CEC: carcinoma espinocelular

CIEF: Capillary isoelectric focusing

CPP: Células progenitoras periféricas

d+80-100: período compreendido entre o dia oitenta e o dia cem após o transplante de células tronco-hematopoéticas

d+8-10: período compreendido entre o dia oito e dia dez após o transplante de células tronco-hematopoéticas

Da: dalton, unidade de medida de massa de partículas atômicas

DECH: doença do enxerto contra hospedeiro

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM: espectrometria de massas

ESI: electrospray Ionization

GO: gene ontology

HLA: Human Leucocyte Antigen

HPLC: high performance liquid chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IAA: iodoacetamida
IgG: imunoglobulina G
ILD: infusão de leucócitos do doador
ipi.HUMAN: Human International Protein Database
IT: ion trap
LC: liquid chromatography
LH: linfoma Hodgkin
LLA: leucemia linfóide aguda
LMA: leucemia mieloide aguda
LMC: leucemia mieloide crónica
LNH: linfoma não-Hodgkin
m/z: massa/carga
MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization
MO: medula óssea
MS/MS: espectrometria de massa em tandem
MS: mass spectrometry
NIH: National Institute of Health
PANTHER: Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PIP: Prolactin-inducible protein
PLUNC: Palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated protein
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PUP: Putative uncharacterized protein
Q: quadrupole
RP-UPLC: reverse phase- ultra performance liquid chromatography

SELDI: surface-enhanced laser desorption/ionization

SGARP 3B: Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B

SMD: síndrome mielodisplásica

SS: Síndrome do Sjögren

TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas

TGI: trato gastrointestinal

TOF: time of flight

Uniprot: Universal Protein Resource

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. PROTEÔMICA	3
2.1.1. Definição e metodologias	3
2.1.2. Fluidos corporais como meio de diagnóstico	7
2.1.3. Proteoma normal da saliva humana	8
2.1.4. Proteoma salivar humano e doenças orais	9
2.1.5. Proteoma salivar humano e as doenças inflamatórias	11
2.1.6. Proteômica salivar e o TCTH	11
2.2.-DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH)	13
2.2.1. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda	14
2.2.2. Doença do enxerto contra hospedeiro crônica	15
3. PROPOSIÇÃO	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2- Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Desenho do estudo	22
4.1.1. Critério de Inclusão de Pacientes	22

4.2.Avaliação clínica	22
4.2.1 Avaliação clínica pré-TCTH	22
4.2.2. Avaliação clínica da mucosite	23
4.2.3.Classificação e diagnóstico da DECH	23
4.2.4- Avaliação Clínica de Hipossalivação	24
4.3-Coleta da amostra de saliva e armazenamento	24
4.3.1. Período de avaliação clínica e coleta das amostras	25
4.4. Análise proteômica	25
4.4.1. Dosagem proteica	25
4.4.2. Digestão das amostras de saliva	26
4.5. Análise dos dados	27
4.5.1. Anotação dos picos e Pesquisa no Banco de Dados	28
4.5.2. Análise da classificação funcional do proteoma	28
4.5.3. Análise Estatística	28
5. RESULTADOS	30
5.1. Características gerais da amostra	30
5.2. Dados clínicos	32
5.2.1. Mucosite oral	32

5.2.2. Avaliação clínica de hipossalivação	33
5.2.3. Avaliação do fluxo salivar não estimulado	34
5.2.4. Característica da Doença do enxerto contra hospedeiro	35
5.3. Estudo do Proteoma	36
5.3.1. Identificação do proteoma salivar	36
5.3.2. Proteínas associadas à Doença do Enxerto contra hospedeiro	41
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	63
ANEXO I - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	63
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	65
ANEXO III- FICHA CLÍNICA UTILIZADA NA PESQUISA	66

1.INTRODUÇÃO

Atualmente, a ciência vive a era pós-genômica, onde a sequência de um gene não deve mais ser considerada isoladamente na predição de sua função. Neste contexto, o estudo das proteínas ou proteômica tem sido ampliado para melhor entendimento dos processos celulares (Wilkins *et al.*, 1996).

Muitas das tecnologias hoje utilizadas na proteômica foram desenvolvidas muito antes do início desta fase. No entanto, foi o domínio da espectrometria de massas que permitiu o avanço do sequenciamento de proteínas e possibilitou o surgimento e desenvolvimento desta nova “ômica” (Tyers & Mann, 2003).

A proteômica emerge também na pesquisa clínica por se acreditar que as proteínas presentes nos fluidos corporais possam refletir as condições de saúde ou de doença. (Weissinger *et al.*, 2006; 2007). Acredita-se, portanto, que algumas proteínas poderiam funcionar como biomarcadores para diversas doenças, o que poderia influenciar no tempo diagnóstico e no tratamento de pacientes (Zhang *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços clínicos, a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) ainda é a principal e mais grave complicação após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, interferindo na qualidade de vida dos pacientes (Reddy, 2008; Schubert &Correa, 2008). O diagnóstico da DECH é dependente dos sintomas clínicos, além da necessidade da confirmação pela biópsia dos órgãos afetados em alguns casos (Kaiser *et al.*,2004; Weissinger *et al.*, 2007; Paczesny *et al.*, 2009, 2013).

Neste contexto, a identificação de biomarcadores que possam predizer ou mostrar esta condição antes do começo dos sintomas; ou que possa distinguir a DECH de outras condições que apresentem sintomas semelhantes; ou que

estratifique os pacientes de acordo com o a resposta à terapia é um desafio que pode trazer benefícios ao tratamento desta doença (Choi *et al.*, 2010).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar prospectivamente a expressão de proteínas salivares em pacientes submetidos ao alo TCTH, comparando a expressão das proteínas salivares em pacientes que desenvolveram e não desenvolveram a doença do enxerto contra o hospedeiro após o transplante. Além disso, elaborar um painel das proteínas eleitas como potenciais biomarcadores para a DECH.

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PROTEÔMICA

2.1.1. Definição e metodologias

O termo proteômica, introduzido em 1995, é a ciência da área da biotecnologia que estuda o conjunto de proteínas (proteoma) expressas por um gene, ou por uma célula, tecido ou mesmo por um organismo em determinado período sob condições definidas (Wasinger *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1995).

A análise proteômica é um campo que emerge também na pesquisa clínica, pois na era pós-genômica o reconhecimento das proteínas sintetizadas pelos genes tornou-se fundamental como complementação ao conhecimento genômico (Weissinger *et al.*, 2006). As proteínas e polipeptídeos encontrados nos fluidos corporais possuem o produto final das informações celulares e teciduais, portanto acredita-se que as alterações destas moléculas possam oferecer uma visão de diferentes condições de saúde e de doença (Weissinger *et al.*, 2006, 2007; Nagler, 2009; Al Kawas *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

A utilização dos estudos de proteômica para determinação de biomarcadores pode auxiliar no diagnóstico precoce de doenças e na evolução das respostas aos tratamentos. Além de oferecer uma nova perspectiva na evolução do acompanhamento médico de pacientes. (Zhang *et al.*, 2012).

Para tanto, tem-se discutido os critérios que definem a aplicação clínica desses estudos, como (1) a identificação de biomarcadores específicos associados com o estado de saúde ou doença; (2) o seguimento de sua abordagem não deve ser invasiva para que possam ser detectados e monitorados, assim bem como as tecnologias empregadas para discriminá-los (Zhang *et al.*, 2012). Atualmente, o aperfeiçoamento da eficácia e acurácia das tecnologias de

proteômica torna o diagnóstico molecular uma realidade mais próxima da rotina clínica (Zhang *et al.*, 2012).

A maioria das metodologias de proteômica, sem utilização de anticorpos, é baseada na espectrometria de massas (EM). Sendo esta uma ferramenta precisa para a caracterização e avaliação de alterações qualitativas e quantitativas das misturas complexas de proteínas (Boja *et al.*, 2011; Paczesny, 2012). Os tipos mais utilizados de técnicas que envolvem a EM para proteômica clínica são: (1) impressão digital do mapa peptídico (*peptide mass fingerprint*), utilizada para identificar proteínas em bancos de sequências sem a necessidade de sequenciar a proteína em estudo. Os valores resultantes dessa análise, expressos na relação massa/carga (m/z) dos peptídeos intactos, são correlacionados às proteínas de um banco de dados específico; (2) *Shotgun proteomics* que permite a identificação de proteínas em misturas complexas utilizando uma combinação da cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*-HPLC) com espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), na qual ocorre a fragmentação dos peptídeos em aminoácidos possibilitando determinar a relação m/z desses resíduos. Essa relação permite a identificação de sequência de aminoácidos, o que torna possível o trabalho com genomas não sequenciados e moléculas desconhecidas (Cunha *et al.*, 2006; Salvato & Carvalho, 2010).

Um espectrômetro de massas é formado basicamente de três partes: o sistema de ionização das moléculas, que é responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente; o analisador de massas, que separa os íons resultantes e o detector, responsável pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos. A molécula deve estar na forma ionizada e no estado gasoso para que possa ser analisada no espectrômetro de massas (Cunha *et al.*, 2006; Salvato & Carvalho, 2010).

Duas técnicas de ionização são predominantes na análise de proteínas: (1) dessorção a laser (MALDI -*matrix-* assisted laser desorption ionization), na qual a mistura proteica ou peptídica é misturada a uma matriz ácida e irradiada com um feixe de laser, cuja energia resultante causa dessorção da molécula. A matriz ácida transfere prótons para moléculas de proteínas, tornando-as ionizadas positivamente e passando-as ao estado gasoso; (2) Eletropulverização ou ESI (*electrospray ionization*), onde a proteína é dissolvida em solução acidificada que é pulverizada em uma agulha metálica ou um capilar de vidro revestido de metal, sendo submetido a intenso campo elétrico, causando a ionização. No sentido contrário ao da pulverização, uma corrente de gás inerte flui causando a dessolvatação (remoção do solvente da amostra líquida), tornando-a gasosa. (Cunha *et al.*, 2006; Salvato & Carvalho, 2010) (Figura 1).

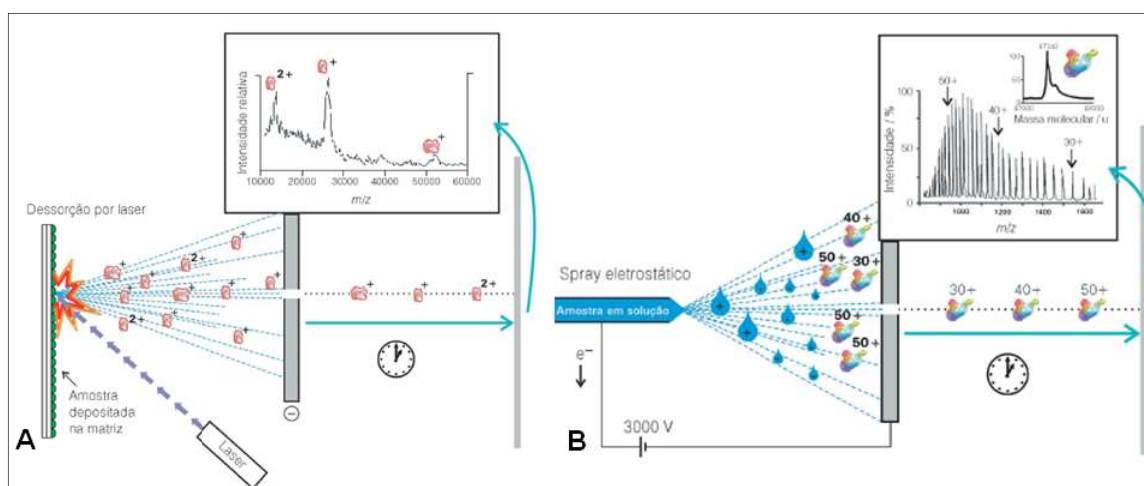


Figura 1- A Diagrama de um espectrômetro de massas com dessorção/ionização por laser. B Diagrama de um espectrômetro de massas com ionização por spray eletrostático (ESI).

Fonte: Colnago *et al.*, 2002

Os principais analisadores de massas são: (1) Tempo de voo, conhecido como TOF (*time-of-flight*), onde as moléculas ionizadas e aceleradas são lançadas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para medida do seu tempo de voo até um detector, sendo este tempo proporcional à massa molar da molécula; (2) Quadrupolo (Q) que utiliza a condução de moléculas ionizadas entre quatro

cilindros metálicos conectados a fontes de radiofrequência para fazer determinados grupos de íons chegarem ao detector; (3) Aprisionamento de íons ou IT (*ion trap*), onde as moléculas são conduzidas para dentro de um compartimento no qual existe um forte campo eletromagnético, onde ficam aprisionadas e são liberadas individualmente (Cunha *et al.*, 2006; Salvato & Carvalho, 2010) (figura 2).

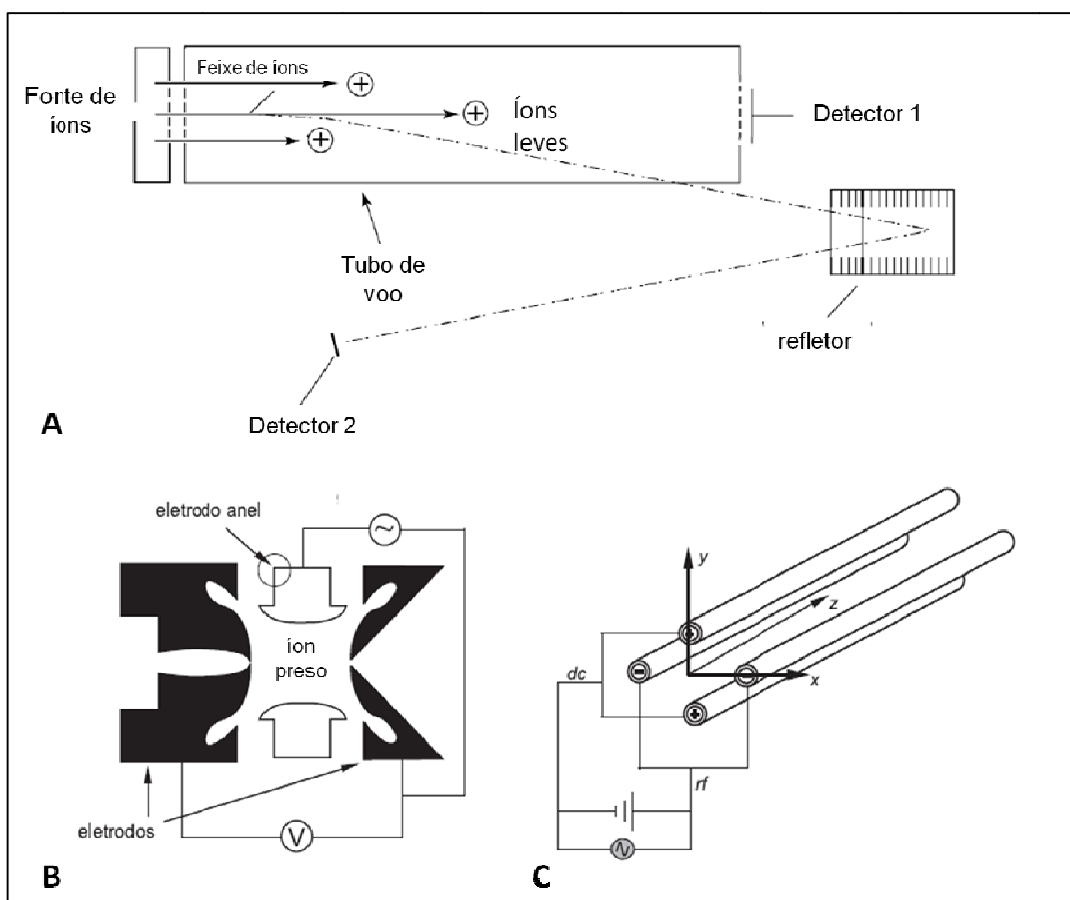


Figura 2- Tipo de analisadores de massas: A Esquema de um analisador tipo TOF; B Esquema de um analisador ion-trap; C sistema de quadrupolos.

Fonte: (A) Ardrey,2003; (B e C) Chiaradia *et al.*, 2008

A *tandem-MS* ou *MS/MS* pode ser entendida como espectrometria de massas de modo sequencial que requer equipamentos apropriados chamados de

híbridos, pois apresentam mais de um analisador de massas. Os mais comuns são o triplo-quadrupólo (Q-Q-Q), quadrupólo-TOF (Q-TOF), TOF/TOF (Figura 3).

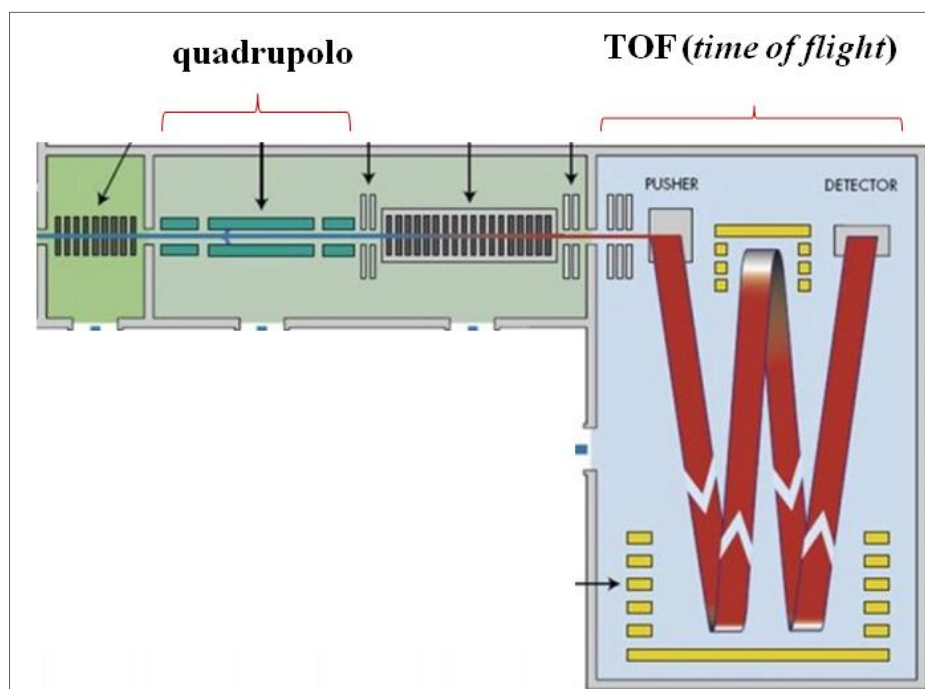


Figura 3- Exemplo de equipamento híbrido contendo um analisador quadrupolo e outro *time of flight*, denominado de Q-TOF.

2.1.2. Fluidos corporais como meio de diagnóstico

O sangue tem sido tradicionalmente o fluido corporal utilizado há várias décadas pela comunidade médica como meio de diagnóstico e controle para diversas doenças (Bigler *et al.*, 2009). Por esta razão, também tem sido utilizado em alguns estudos de proteômica para a descoberta de biomarcadores. Entretanto, o sangue apresenta desvantagens por ser um meio complexo e que pode exibir variações das expressões das proteínas de processos patológicos ocorridos anteriormente ao estado atual do organismo (Streckfus & Dubinsky, 2007; Bigler *et al.*, 2009).

Exemplo de utilização de fluidos corpóreos nos estudos de proteômica podem ser vistos nos trabalhos publicados por Kaiser *et al.* (2004) e Weissinger *et al.*(2007). Ambos autores utilizaram a urina para análise por EM de peptídeos que pudessem identificar precocemente aqueles pacientes que desenvolveriam complicações após o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH). Os resultados de Kaiser *et al.* (2004) permitiram a identificação de dezesseis peptídeos para doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), assim como a diferenciação desta doença de septicemia. Enquanto Weissinger *et al.*(2007) detectaram treze peptídeos que permitiram a identificação das amostras de DECH aguda com 95% de confiança. A análise da urina pode ser considerada como um método rápido, reprodutível e sensível na determinação das complicações pós-TCTH.

Além do sangue e urina, a saliva também tem sido utilizada em diversos estudos para identificação de biomarcadores (Giusti *et al.*, 2007; Rudney *et al.*, 2009; Ferraccioli *et al.*, 2010; Haigh *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011). A saliva oferece diversas vantagens para o propósito diagnóstico quando comparado aos outros fluidos corporais. Primeiramente, a coleta é não invasiva, indolor e de baixo custo. Além disso, a composição salivar apresenta menos sal quando comparada a urina e a concentração de proteína total não é representada pela contribuição de um pequeno grupo prevalente de proteínas, como é o caso da albumina nos produtos derivados do sangue (Bigler *et al.*, 2009; Amado *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Outra característica da saliva é que as amostras são de fácil preparação, pois exigem apenas centrifugação antes do armazenamento e a adição de um coquetel de inibidores de proteases para reduzir degradação das proteínas para armazenamento por período prolongado (Bigler *et al.*, 2009).

2.1.3- Proteoma normal da saliva humana

Antes do estudo de biomarcadores para as mais diversas doenças foi necessário mapear o proteoma da saliva humana em condições normais. Devido a esta necessidade, o trabalho colaborativo de três grupos de pesquisas dos Estados Unidos (Denny *et al.*, 2008) contribuiu para a produção de um catálogo de proteínas da saliva humana coletada das glândulas parótidas e submandibulares. Este estudo demonstrou que 174 de 657 proteínas encontradas no plasma e 236 de 467 proteínas achadas em lágrimas também estavam presentes na saliva (Denny *et al.*, 2008) mostrando portanto a validade da inclusão da saliva em estudos de biomarcadores.

O resultado da análise proteômica da saliva publicado por Xie *et al.*(2005) mostrou 918 tipos moleculares encontradas na saliva de um voluntário saudável. Entretanto, foram identificadas com alta confiabilidade 437 proteínas. Considerando a escassez de informações sobre o proteoma salivar, um banco de dados foi criado pelo *National Institute for Dental and Craniofacial Research* (NIDCR) que teve como objetivo coletar a maior quantidade de informações possíveis das proteínas e peptídeos presentes na saliva (Hu *et al.*, 2007a).

2.1.4. Proteoma salivar humano e doenças orais

Alguns estudos na área da proteômica têm surgido para avaliação de cárie dentária e doença periodontal. Rudney *et al.*(2009) utilizaram de abordagem proteômica para identificar possíveis biomarcadores para demonstrar susceptibilidade dos pacientes à cárie dentaria. A comparação da saliva total de pacientes considerados de alto risco e baixo risco para o desenvolvimento de cárie mostrou que níveis reduzidos das proteínas estaterina e cistatina S truncada são potenciais indicadores de risco para esta doença. Estes resultados sugeriram uma possível associação entre as funções moleculares dessas proteínas e propriedades antimicrobianas da saliva.

Mungia *et al.*(2008) demonstraram associação positiva entre experiência de cárie dentária, idade do paciente e a concentração das proteínas lactoferrina, albumina, lisozima, mucina e cistatinas na saliva das glândulas submandibular e sublingual. Além disso, foi observada associação com componentes inorgânicos, como potássio, cálcio, sódio e cloro.

Vários são os trabalhos publicados sobre alterações de proteínas salivares na doença periodontal, envolvendo a identificação de biomarcadores para diagnóstico e, mais frequentemente, prognóstico desta doença (Gonçalves *et al.*, 2010; Haigh *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011).

Gonçalves *et al.* (2010) compararam o proteoma salivar em pacientes saudáveis e com periodontite crônica. Nos pacientes com a doença periodontal foi observado aumento de proteínas sanguíneas, incluindo as imunoglobulinas, além de baixa quantidade de cistatina em comparação com o grupo controle. Os pacientes com periodontite grave investigados por Haigh *et al.*(2010) tiveram a saliva coletada antes e após tratamento da doença. Estes autores observaram quantidade aumentada da proteína S100 antes do tratamento, relacionada à regulação da inflamação.

Outro campo de estudos em proteômica salivar está na identificação de marcadores de neoplasias orais (Nagler *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007b; Nagler, 2009). Hu *et al.*(2007b) através do uso da espectrometria de massas, identificaram peptídeos e proteínas no fluido oral potencialmente úteis para detecção do carcinoma espinocelular oral (CEC). Nagler *et al.*(2006) investigaram seis marcadores tumorais circulatórios na saliva dos pacientes com CEC oral, que foram a Cyfra 21-1, antígeno polipeptídico tecidual (TPS), CA125, antígeno carcinoembriogênico (CEA), antígeno do carcinoma de células escamosas (SCC) e CA19-9. Estes autores encontraram um aumento de 400% na concentração salivar das três primeiras proteínas descritas nos pacientes com o tumor.

2.1.5. Proteoma salivar humano e as doenças inflamatórias

As proteínas salivares também foram utilizadas para estudo de doenças inflamatórias que possuem manifestações orais. Yang *et al.*(2006), avaliaram pacientes com líquen plano oral e observaram níveis aumentados de pré-caliceína urinária e uma diminuição de PLUNC (*Palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated protein*) na saliva, caracterizando potenciais biomarcadores para esta doença.

Por atingir diretamente as glândulas salivares, a síndrome de Sjögren também teve o proteoma salivar amplamente estudado (Giusti *et al.*, 2007; Ferraccioli *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011). Ryu *et al.*(2006) utilizaram eletroforese 2-D e em seguida EM SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization) e identificaram o perfil proteico da saliva coletada da parótida nestes pacientes apresentava uma mistura de proteínas inflamatórias aumentadas e diminuição de proteínas acinares quando comparadas com os pacientes sem síndrome.

Giusti *et al.* (2007) também encontraram proteínas pré inflamatórias, tais como ciclofilina A e calgranulina em pacientes com SS e que não foram observadas no grupo controle. Enquanto Fleissig *et al.* (2009) identificaram dois padrões de expressão de proteínas salivares no grupo com SS, porém não demonstraram nenhuma associação com o grau clínico, sorológico ou histológico da doença.

2.1.6. Proteômica salivar e o TCTH

O estudo da saliva nos pacientes submetidos ao TCTH é um tópico que tem sido discutido principalmente pelo envolvimento das glândulas salivares no âmbito do TCTH. No entanto, grande parte destes estudos objetivou avaliar dados de fluxo salivar, alterações de componentes inorgânicos e de proteína total (Nagler *et al.*, 1996a,b; Nagler *et al.*,1997; Nagler & Nagler, 2001).

Nagler *et al.* (1997) demonstraram diminuição do fluxo salivar nos pacientes submetidos a imunoterapia com interleucina-2/Interferon- α (IL-2/IFN- α) após transplante autólogo de células hematopoéticas. Estes autores também observaram aumento da concentração de potássio e diminuição do sódio na saliva estimulada da glândula parótida, além disso, a concentração da proteína total não foi alterada pela terapia (Nagler *et al.*, 1997).

Diversos estudos, tanto em modelos animais como em humanos, demonstraram uma taxa em torno de 55-90% de diminuição no fluxo salivar de pacientes com DECH (Nagler *et al.*, 1996a; b; Nagler & Nagler, 2001). Um aumento significativo na concentração salivar de sódio, magnésio, fator de crescimento epidermal, proteína total, albumina e IgG foi observado na saliva de pacientes com DECH quando comparados aos controles nestes estudos (Nagler *et al.*, 1996a; b; Nagler & Nagler 2001).

Em 2007, Imanguli *et al.* publicaram um estudo inicial sobre proteoma salivar nos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco-hematopoéticas. Nesta publicação os autores usaram o espectrômetro de massas SELDI-TOF e eletroforese 2D para identificação das proteínas alteradas no pré-TCTH, um mês e seis meses após alo TCTH. As proteínas lactoferrina, cistatina SN, albumina e amilase salivar se mostraram aumentadas um mês após o alo TCTH, sendo que as duas primeiras possuem propriedades antimicrobianas e imunoregulatórias (Imanguli *et al.*, 2007). Essas proteínas teriam um potencial para compor um painel de proteínas salivares na determinação da DECH.

Recentemente, Bassim *et al.* (2012) publicaram estudo utilizando espectrometria de massas para avaliação proteômica salivar dos pacientes com DECH. Estes autores avaliaram a expressão de proteínas num grupo de pacientes que apresentaram a doença oral com um grupo sem manifestação oral, onde observaram doze proteínas identificadas somente no último grupo. Estes autores também conseguiram observar redução das proteínas lactoperoxidase,

lactotransferrina, e de vários inibidores de cisteína proteinase nos pacientes com DECH oral, sugerindo uma imunidade antimicrobiana oral comprometida nestes pacientes (Bassim *et al.*, 2012)

O estudo proteômico no âmbito do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas pode auxiliar na identificação daqueles pacientes que apresentam potencial para o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, o que pode ter grande repercussão no tratamento desse grupo de pacientes.

2.2.-DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH)

A DECH é considerada principal complicação do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (alo TCTH), limitando a sobrevida e causando maior morbidade (Reddy *et al.*, 2008).

A DECH é uma condição imunologicamente mediada, em que os linfócitos T imunocompetentes do doador reconhecem os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro como estranhos. Desta maneira, estas células T reagem diretamente contra os tecidos dos pacientes, ou através de uma resposta inflamatória exagerada (Schubert &Correa, 2008; Choi *et al.*, 2010). No contexto das malignidades hematológicas, existe um equilíbrio delicado entre as consequências graves da DECH e os efeitos benéficos incorridos quando os linfócitos do doador atacam as células malignas do receptor (Choi *et al.*, 2010).

Billingham (1966) definiu três condições fundamentais para o desenvolvimento da DECH: (1) presença de células imunocompetentes no enxerto; (2) o receptor deve expressar antígenos de histocompatibilidade não presentes no doador; (3) receptor deve ser incapaz de promover resposta efetiva para eliminar as células transplantadas.

A DECH se apresenta duas formas principais: aguda (DECHa) e crônica (DECHc). O consenso atual do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados

Unidos é que manifestações clínicas determinam quando a DECH é aguda ou crônica (Filipovich *et al.*, 2005).

2.2.1. Doença do enxerto contra hospedeiro aguda

A DECHa inclui DECH aguda clássica, ocorrendo dentro de 100 dias após alo TCTH ou infusão de leucócitos do doador (ILD); e a DECHa persistente, recorrente ou aguda de início tardio (aguda tardia), ocorrendo mais de 100 dias após o TCTH ou ILD (Filipovich *et al.*, 2005).

A DECHa é a resposta exacerbada dos mecanismos de inflamação normais que envolvem as células T do doador e múltiplas células inatas e adaptativas e mediadores. Três fases sequenciais foram conceitualizadas para ilustrar as interações e cascatas inflamatórias que envolvem a DECHa: (1) ativação das células apresentadoras de antígenos; (2) ativação, proliferação, diferenciação e migração das células T do doador; (3) fase efetora, onde ocorre a destruição do tecido alvo (Reddy *et al.*, 2008; Ferrara *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010).

Na primeira fase ocorre ativação das células apresentadoras de antígenos através do dano gerado ao tecido hospedeiro pela doença de base e o regime de condicionamento pré-transplante. A resposta do tecido hospedeiro é a ativação de citocinas inflamatórias, antígenos de MHC e moléculas coestimulatórias de células apresentadoras de antígenos (Reddy *et al.*, 2008; Ferrara *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010).

Na segunda fase ocorre a proliferação e diferenciação das células T do doador em resposta às células apresentadoras de antígenos do hospedeiro. Na última fase as células T ativadas produzem células efetoras adicionais que medeiam o dano tecidual, incluindo os linfócitos T citotóxicos, células Natural killer (NK), TNF α e IL-1. O TNF α pode causar destruição tecidual direta pela indução de necrose e apoptose na pele e no trato gastrointestinal (TGI).

A DECHa envolve principalmente três sistemas de órgãos: a pele, trato gastrointestinal (TGI) e o fígado. A pele é mais comumente afetada, apresentando normalmente erupções cutâneas, podendo ocorrer bolhas e ulcerações (Goker *et al.*, 2001; Ferrara *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010). As primeiras manifestações da DECH em fígado são a icterícia com hiperbilirrubinemia conjugada e uma elevação da concentração de fosfatase alcalina. Enquanto o envolvimento do TGI geralmente é marcado por diarreia e cólicas abdominais (Goker *et al.*, 2001; Ferrara *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010).

2.2.2. Doença do enxerto contra hospedeiro crônica

A DECHc é a principal causa de morte tardia não relacionada a recaída após alo TCTH e está associada com a diminuição na qualidade de vida dos pacientes (Filipovich, 2008; Schubert & Correa, 2008; Ferrara *et al.*, 2009). A síndrome tem características parecidas com distúrbios imunológicos e auto-imunes, tais como a esclerodermia, SS, cirrose biliar primária, síndrome de caquexia, bronquiolite obliterante (BO), citopenias imune, crônica e imunodeficiência (Filipovich *et al.*, 2005).

No entanto, o entendimento da patofisiologia da DECH crônica (DECHc) não é tão avançado como a DECHa. As células T aloreativas foram implicadas na patogênese, no entanto, o papel exato de subtipos de células T específicas, autoantígenos, aloantígenos e células B, além das interações de quimiocinas e citocinas, não foi completamente esclarecido (Vogelsang *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2010). Ambos os linfócitos CD4 + e CD8 + foram implicadas como mediadores primários da DECHc. Isto se baseia na hipótese de que o sistema imunitário reconhece os antígenos do doador com exceção do antígeno de leucócitos humanos (HLA) como alvos de ataque. Diferenças no HLA do doador e hospedeiro formam a base do ataque imunológico (Reddy *et al.*, 2008).

O diagnóstico de DECHc é baseado em sinais específicos mais do que no tempo pós-transplante, sendo necessária para o diagnóstico a presença de pelo menos um sinal clínico de diagnóstico de GVHDc ou a presença de pelo menos uma manifestação clínica distinta, confirmado por biópsia ou outros testes relevantes no mesmo órgão ou em outro (Filipovich *et al.*, 2005; Filipovich, 2008). Para o diagnóstico da DECHc também há sinais e sintomas que a caracterizam, podendo envolver a pele e anexos, boca, olhos, genitália feminina, esôfago, pulmões e tecidos conjuntivos (Tabela 1) (Filipovich *et al.*, 2005; Filipovich, 2008).

Tabela 1- Sinais e sintomas característicos da Doença do enxerto contra hospedeiro crônica (Choi *et al*, 2010)

Órgão ou local	Diagnóstico (suficiente para estabelecer o diagnóstico de DECHc)	Distintivo (presente em DECHc, mas insuficiente isoladamente para estabelecer o diagnóstico da DECHc)	Outras características	Comum (atividade com DECH aguda e crônica)
Pele	Poiquilodermia Características semelhantes a Líquen plano, Morfêa ou Líquen escleroso	Despigmentação	Diminuição do suor Ictiose Queratose pilar Hipopigmentação hiperpigmentação	Eritema erupções maculopapulares prurite
Unhas		Distrofia sulco longitudinal, divisas ou características quebradiças		
Couro cabeludo e pelos		Aparecimento de cicatrizes Alopecia (depois da recuperação da quimioterapia) Lesões papuloescamosas Descamação	Cabelos ralos, tipicamente irregular, grosseiro, ou sem brilho (não explicado por alteração endócrina ou outras causas) cabelo grisalho prematuro	
Boca	Lesões líquenóides Placas hiperqueratóticas Restrição abertura bucal por esclerose	Xerostomia Mucocelos Atrofia de mucosa Pseudomembranas úlcera		Gengivite Mucosite Eritema Dor
Olhos		Olhos secos, arenosos ou doloridos	Fotofobia Hiperpigmentação periorbital Blefarite	
Genitália	Lesões semelhantes a Líquen plano cicatrizes vaginal ou estenose	Erosão, Fissuras Úlceras		

TGI	Teias esofágicas Estenoses no terço superior ao médio do esôfago		Insuficiência pancreática exócrina	Anorexia Náusea Vômitos Diarreia Perda de peso Falha de crescimento (bebês e crianças) Bilirrubina total, fosfatase alcalina 2x maior que o normal ALT ou AST 2 x maior que o normal
Pulmões	Bronquiolite obliterante diagnosticado com biopsia de pulmão	Bronquiolite obliterante diagnosticado com teste de função pulmonar e radiografia		Bronquiolite obliterante com pneumonia em organização
Músculos, fáscia, articulações	Fascite Rigidez articular ou contraturas secundária a esclerose	Miosite de polimiosite	Edema Cãibras musculares Artralgia ou artrite	
Hematopoéticos e imunes			Trombocitopenia Eosinofilia Linfopenia Hipo ou hipergamaglobulinemia Auto-anticorpos (anemia hemolítica autoimune e púrpura trombocitopênica idiopática)	
Outros			Derrame pleural ou pericárdico Ascite Neuropatia periférica Síndrome nefrótica Miastenia grave Anormalidade da condução cardíaca ou cardiomiopatia	

O envolvimento oral é um componente frequente na DECHc, sendo importante e útil no diagnóstico e estadiamento da doença. A frequência do acometimento oral tem sido relatada em 72% a 83% dos pacientes com DECHc (Schubert &Correa, 2008). Como descrito na tabela 1, as características principais da DECHc oral incluem: inflamação da mucosa, lesões liquenóides (estrias, placas, pápulas ou manchas), atrofia, ulcerações pseudomembranosas, mucocelos e fibrose perioral (Imanguli *et al.*, 2008; Schubert & Correa, 2008) (Figura 4).

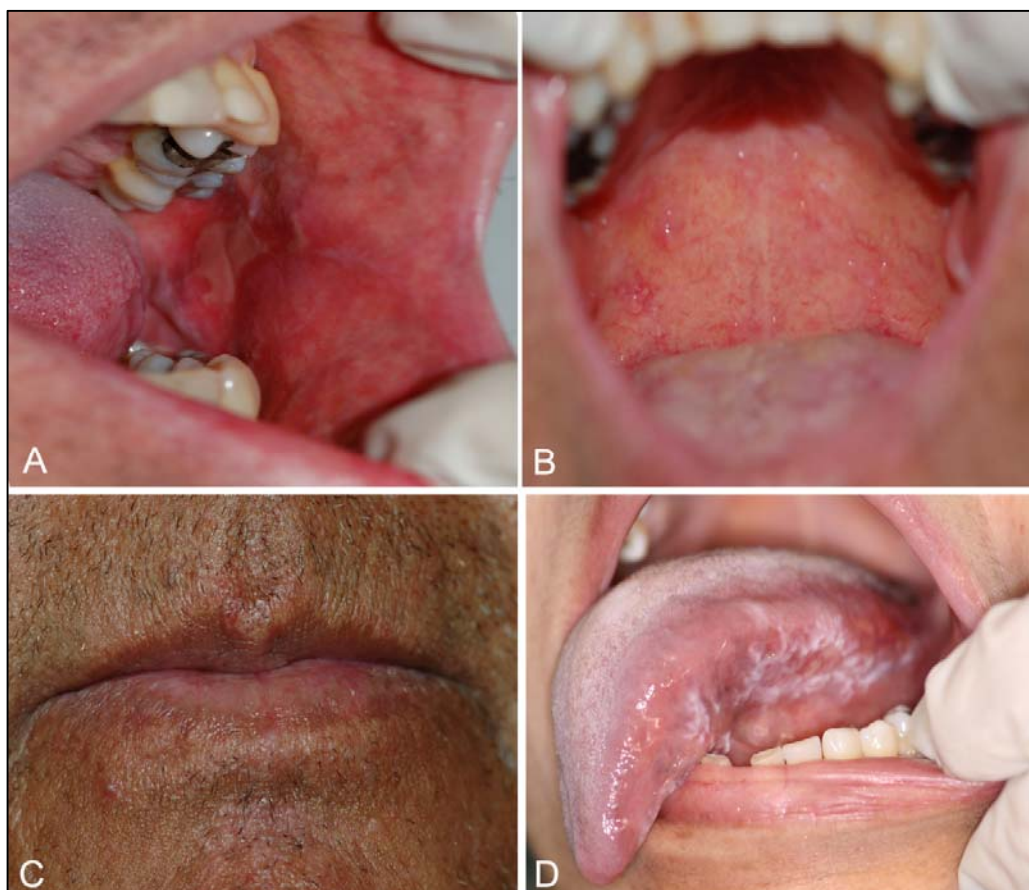


Figura 4- (A) mucosa jugal eritematosa com úlcera pseudomembranosa (B) mucocelos em palato (C) lábio inferior com alteração de coloração e fibrose inicial (D) lesões liquenóides em lateral de língua.

O NIH considera para estadiamento da DECHc oral somente eritema, lesões liquenóides, úlceras e mucoceles. O escore da boca varia entre 1 -15 de acordo com a extensão/número destas alterações da mucosa (Filipovich *et al.*, 2005; Filipovich, 2008).

O diagnóstico de DECH é baseado em critérios clínicos, sendo necessária a biópsia de determinados órgãos para confirmação em alguns casos. Alguns dados laboratoriais ou estudos de imagens também podem ser úteis para o diagnóstico. No entanto, os pesquisadores ainda buscam por um teste laboratorial que possa prever ou mostrar esta condição antes do começo dos sintomas. Assim como, distinguir a DECH de outras condições que apresentem sintomas semelhantes, ou que estratifique os pacientes de acordo com o a resposta à terapia (Choi *et al.*, 2010).

Dessa forma, o estudo da proteômica para elaborar um painel de possíveis biomarcadores com significado diagnóstico e prognóstico poderá permitir a identificação de grupo de pacientes com risco aumentado e eventualmente, melhorar o tratamento da DECH e das demais complicações pós alo TCTH (Kaiser *et al.*, 2004; Weissinger *et al.*, 2007; Paczesny *et al.*, 2013).

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Objetivo geral:

- Avaliar o proteoma salivar em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1- Comparar o perfil das proteínas salivares em pacientes que desenvolveram e não desenvolveram a doença do enxerto contra hospedeiro após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

3.2.1 – Elaborar um painel de proteínas salivares que possam ser estudadas como biomarcadores para a doença do enxerto contra hospedeiro

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Desenho do estudo

Este foi um estudo observacional, longitudinal, prospectivo, que incluiu pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e não malignas submetidos ao primeiro transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, mieloablativo ou não mieloablativo na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Unicamp, durante o período de 2010 a 2012.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP, parecer N.º 1297/2010 (Anexo I). Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II: TCLE).

4.1.1. Critério de Inclusão de Pacientes:

Foram incluídos pacientes adultos (idade > 18 anos), de ambos os sexos, que receberam o primeiro transplante, HLA (*Human Leucocyte Antigen*) compatível de células-tronco hematopoéticas, provenientes tanto da aspiração da medula óssea (MO) ou por aférese das células progenitoras periféricas (CPP) e que não apresentavam progressão da doença de base no momento da entrada no estudo.

4.2. Avaliação clínica

Todos os dados e avaliações foram coletados em uma ficha clínica elaborada especificamente para o estudo (Anexo III).

4.2.1. Avaliação clínica pré-TCTH

Todos os pacientes foram submetidos ao exame clínico oral antes do TCTH, sendo este complementado pela realização de radiografia panorâmica para

avaliação das estruturas ósseas dos maxilares. Quando necessário os pacientes foram submetidos a tratamento odontológico, incluindo exodontias dentárias, tratamento periodontal e adequação do meio bucal com o objetivo de remoção de focos infecciosos presentes.

4.2.2. Avaliação clínica da mucosite

A mucosite oral foi avaliada entre os dias d+8-10, utilizando-se os critérios estabelecidos pela escala da Organização Mundial de Saúde (OMS-1979), demonstrada na tabela 2 :

Tabela 2- Classificação da gravidade da mucosite oral de acordo com a OMS, 1979

Gravidade da mucosite	Características Clínicas
0	Ausência de sintomatologia.
1	Inflamação da mucosa oral e sensibilidade, sem úlceras.
2	Inflamação da mucosa oral e presença de úlceras, mas o paciente é capaz de comer normalmente.
3	Paciente não é capaz de ingerir dieta sólida, somente dieta líquida.
4	Paciente é incapaz de comer e beber.

4.2.3. Classificação e diagnóstico da DECH

O diagnóstico da DECH foi realizado baseado nas descrições e classificações definidas pelo Consenso em DECH do *National Institute of Health* (Filipovich *et al.*, 2005). Desta maneira, duas principais formas de DECH são reconhecidas: a DECH aguda e DECH crônica, cada uma com duas subcategorias.

A DECH aguda pode ser clássica, ocorrendo dentro de 100 dias após TCTH ou infusão de leucócitos do doador (ILD) e ou persistente, recorrente ou aguda de início tardio (aguda tardia), ocorrendo mais de 100 dias após o TCTH ou ILD.

A categoria de DECH crônica inclui a clássica, apresentando manifestações que podem ser atribuídas apenas à DECH crônica. A outra categoria é a sobreposição, que tem diagnóstico ou manifestações distintas de DECH crônica concomitante com características típicas de DECH aguda. Em cavidade oral, a manifestação clínica da DECH crônica oral inclui: a presença de lesões liquenóides, eritema, ulcerações e mucocelos. (Anexo III- Ficha clínica).

4.2.4- Avaliação Clínica de Hipossalivação

Os critérios de hipossalivação utilizados no estudo foram os anteriormente publicados por Alborghetti *et al.* (2005) que incluem: a ausência de lago salivar sublingual, o espessamento salivar, a aderência da espátula de madeira à mucosa jugal e a ausência de secreção salivar à estimulação manual dos ductos das parótidas (ducto de *Stenon*).

4.3-Coleta da amostra de saliva e armazenamento

As coletas de saliva seguiram a metodologia adaptada da publicada por Davies *et al.* (2002). Essas coletas foram realizadas no período da manhã com intervalo de uma hora após a refeição e/ou com mesmo intervalo da última higiene bucal. Foi solicitado ao paciente que ficasse sentado e antes da coleta deglutisse a saliva presente na cavidade bucal. A saliva secretada a cada trinta segundos durante cinco minutos foi coletada em um recipiente estéril e pré-pesado. O fluxo salivar foi estimado pela quantidade coletada neste e dividida pelo intervalo de tempo. Uma segunda coleta foi realizada caso a quantidade de 1 mL não fosse atingida na primeira. Com objetivo de inibir a ação das proteases foram adicionados ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e fluoreto de

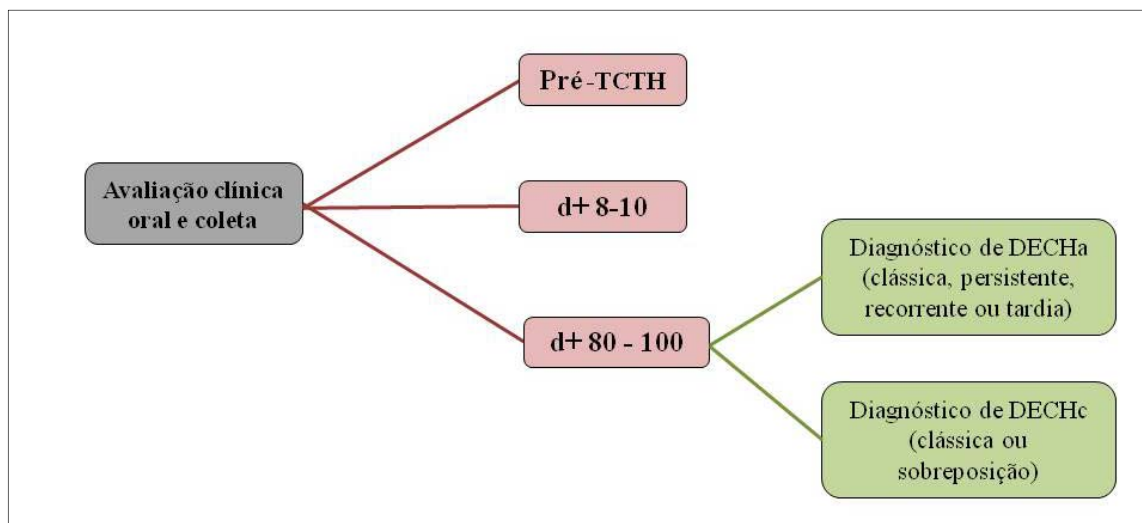
fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) nas amostras de saliva (Gonçalves *et al.*, 2010).

Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em gelo a 4°C e em seguida, centrifugadas na velocidade máxima de 14000 rpm por 5 minutos para remoção de materiais insolúveis, células descamadas e restos alimentares. O sobrenadante foi acondicionado em tubos de 1,5 ml e armazenado em freezer a - 80°C.

4.3.1. Período de avaliação clínica e coleta das amostras

Foram planejados três períodos de coleta de saliva, como abaixo exemplificados na Figura 5:

Figura 5- Períodos de coleta da saliva para o estudo de análise do proteoma salivar



TCTH: transplante de células tronco-hematopoéticas; DECH: doença do enxerto contra hospedeiro (aguda ou crônica); d+: dias após o TCTH

4.4. Análise proteômica

4.4.1. Dosagem proteica

A concentração proteica total das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) protocolo utilizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBIO) para leitura em placa de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), usando albumina bovina (BSA- *Bovine serum albumin*- Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como padrão. As amostras foram plaqueadas com solução de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em duplicata em placas de 96 poços. A preparação foi incubada por dez minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os valores das absorvâncias foram determinados a 595nm em um leitor de ELISA (Bio Rad., Hercules, CA, EUA). A concentração proteica da amostra foi determinada fazendo-se a equação da curva padrão, utilizando-se o programa Excel[®] 2007 (Microsoft, WA, EUA).

4.4.2. Digestão das amostras de saliva

Cinquenta microgramas (μg) da proteína total de cada amostra foram utilizadas para análise. Primeiramente, foram adicionados 5 μL de Ditioneitol (DTT – *Merck Milipore*, Darmstadt, Alemanha) 10mM nas amostras para redução das proteínas a peptídeos e incubado por trinta minutos a 60 °C. A seguir, para alquilação foram adicionados 5 μL da solução de Iodoacetamida (IAA- *Merck Milipore*, Darmstadt, Alemanha) 50 mM e incubado por mais trinta minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, foi adicionada uma solução de tripsina da Promega (Madison, WI, EUA) e as amostras foram incubadas durante 16 horas a 37°C. No segundo dia do procedimento, foi adicionado ácido fórmico (*Merck Milipore*, Darmstadt, Alemanha) na concentração final de 1% com a finalidade de neutralizar a digestão da tripsina. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por dez minutos em temperatura ambiente, sendo a seguir liofilizadas em centrífuga a vácuo (*Speed Vac- Thermo Fischer scientific*, Street Waltham, MA, EUA) e armazenadas a -20°C até a realização da análise.

Para análise no espectrômetro de massas, os peptídeos foram resuspendidos em 20 μL de ácido fórmico 0,1 % e 4.5 μL da amostra foi separada

por uma coluna C18 (100 μ m \times 100 mm) de fase reversa para nano-cromatografia líquida de ultra eficiência (RP-UPLC- Reversed-phase Ultra-Performance Liquid Chromatographic) nanoAcquity (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA, EUA) com fonte *nanoelectrospray* e tempo de voo de 0.6 μ L/min (Figura 6). O gradiente foi 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% durante 45 minutos. A voltagem do nanoeletrospray foi ajustada em 3.5kV e a do cone em 30 V, e a temperatura da fonte foi de 100°C. O instrumento foi operado no modo *top three*, no qual um espectro MS foi adquirido seguido por MS/MS dos três primeiros picos mais intensos detectados. Após fragmentação MS/MS, o íon foi colocado num lista de exclusão por 60 segundos.

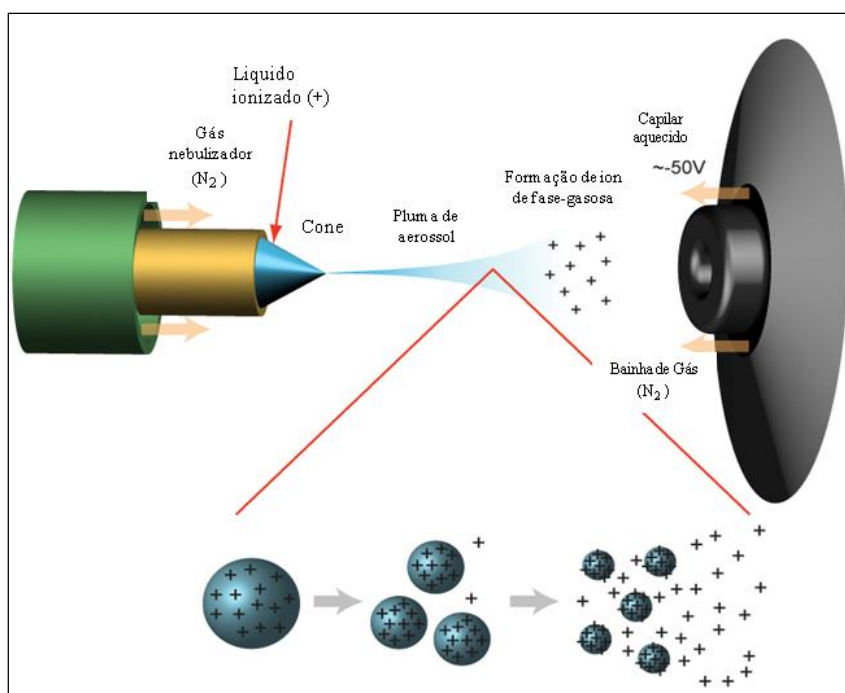


Figura 6: Fonte de ionização *nanoelectrospray* utilizada neste estudo ajustada em 3.5kV e a do cone em 30 V, e a temperatura da fonte foi de 100°C.

4.5. Análise dos dados

4.5.1. Anotação dos picos e Pesquisa no Banco de Dados

Os espectros foram obtidos utilizando o software MassLynx v.4.1 (Waters, MA, EUA) e os dados brutos foram convertidos em formato de lista de picos (mgf) pelo Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). A seguir os dados foram confrontados com *Human International Protein Database* (ipi.HUMAN.v3.86) utilizando o Mascot v.2.3.01 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) com uma tolerância de 0,1Da para o íon precursor, uma tolerância da massa do peptídeo de 0,1Da, e uma clivagem de tripsina perdida. A iodoacetamida derivada de cisteína e a oxidação da metionina foram especificadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Os arquivos resultantes da busca foram carregados no software Scaffold (Scaffold 3_00_3, Proteome® Software Inc. Portland, OR, EUA) e o valor quantitativo de espectros foi obtido para cada proteína identificada nas amostras.

4.5.2. Análise da classificação funcional do proteoma

As proteínas foram classificadas de acordo com *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000) em três categorias: função molecular, processo biológico e componente celular. Para tanto foi utilizado o sistema de classificação *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships–PANTHER* (Mi *et al.*, 2010), disponível no site www.pantherdb.org, que utiliza estatísticas binomiais, determinando a probabilidade de que cada função biológica atribuída a um conjunto de dados é devido ao acaso.

4.5.3. Análise Estatística

Foi utilizado o teste exato de *Fisher* para avaliação dos parâmetros clínicos de hipossalivação no pacientes com DECH crônica. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliação longitudinal dessas variáveis. O valor de p considerado significativo foi menor que 0,05.

Para avaliação proteômica, os valores quantitativos, que normalizam as contagens espectrais nas amostras para cada proteína, foram comparados entre os grupos de pacientes que apresentaram DECH crônica (DECH+) com aqueles que não desenvolveram a doença (DECH-).

As proteínas mais representativas tiveram os valores comparados por meio da razão entre o grupo DECH+ e DECH- nas fases: pré-TCTH, no d+8 -10 e no d+80 -100. A razão foi calculada dividindo-se o valor médio dos indivíduos DECH+ pelo valor médio dos DECH-. Ao final foi estabelecida a razão entre os valores do d+80-100 pelo d+8-10 e deste cálculo as proteínas que mostraram variação maior que 100% ou valores $\leq 0,5$ e >2 foram consideradas significativas.

As partir deste momento, o valor de cada proteína, medido em contagens de espectros será denominado nível da proteína.

5. RESULTADOS

5.1. Características gerais da amostra

Vinte pacientes submetidos ao TCTH alogênico foram incluídos no estudo. Quatorze pacientes (70%) receberam enxerto de células progenitoras periféricas (CPP) e seis (30%) da medula óssea (MO).

Do total de pacientes, doze (60%) eram do sexo feminino e oito (40%) do sexo masculino, com idade média de 40 (20-68) anos de idade. Do total de vinte casos, dezessete (85%) foram constituídos de neoplasias hematológicas, sendo seis casos (30%) de leucemia mielóide aguda (LMA), três casos (15%) de leucemia mielóide crônica (LMC), três casos (15%) de linfoma não-Hodgkin (LNH), dois casos (10%) de leucemia linfóide aguda (LLA) e um caso (5%) de linfoma de Hodgkin (LH), um de mielofibrose (5%) e um caso (5%) de síndrome mielodisplásica (SMD). Entre as doenças não neoplásicas, houve dois casos (10%) de anemia aplástica grave (AAG) e um (5%) de anemia falciforme (AF) (tabela 3).

Os protocolos de regime de condicionamento, de profilaxia para a DECH e a fonte de células estão detalhados na tabela 3.

Foram vinte pacientes avaliados no primeiro e segundo períodos do estudo. No entanto, três faleceram antes da terceira avaliação/coleta, totalizando 17 pacientes neste último período.

Tabela 3- Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo

Característica	N=20
Idade, média (variação)	40 (20- 68)
Gênero	
Feminino: Masculino	12:8
Diagnóstico, n°. (%)	
Leucemia mielóide aguda	6 (30)
Leucemia mielóide crônica	3 (15)
Linfoma não-Hodgkin	3 (15)
Leucemia linfóide aguda	2 (10)
Anemia aplástica grave	2 (10)
Linfoma de Hodgkin	1 (5)
Mielofibrose	1 (5)
Anemia falciforme	1 (5)
Síndrome mielodisplásica	1 (5)
Gênero doador/receptor, n° (%)	
feminino→ masculino	5 (25)
Outros	15 (75)
Tipo de doador, n° (%)	
HLA idêntico	20 (100)
Fontes das células hematopoéticas, no. (%)	
Medula óssea	6 (30)
Célula progenitora periférica	14 (70)
Regime de condicionamento, no. (%)	
Mieloablativo	13 (65)
Não- mieloablativo (intensidade reduzida)	7 (35)
Profilaxia para DECH	
Metotrexato + ciclosporina	15 (75)
Ciclosporina + Micofenolato de mofetila	4 (21)

5.2. Dados clínicos

5.2.1. Mucosite oral

Dos vinte pacientes estudados, quinze (75%) desenvolveram mucosite oral durante o período do transplante. Deste total, oito pacientes desenvolveram mucosite Grau II somente um (6,7%) apresentou mucosite Grau III e seis (40%) mucosite Grau IV, como demonstrado na Figura 7.

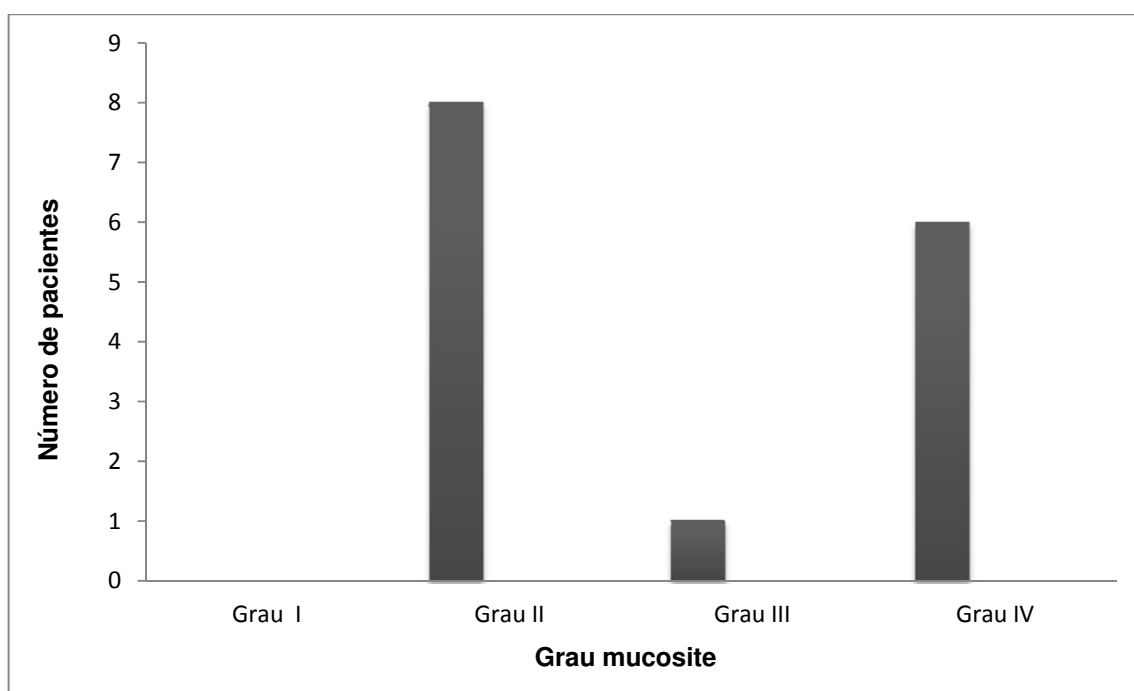


Figura 7- Distribuição e gravidade da mucosite oral nos pacientes incluídos no estudo. Dados coletados entre os dias d+8-10.

5.2.2. Avaliação clínica de hipossalivação

No período pré-TCTH, quinze dos vinte pacientes (75%) apresentaram aderência da espátula de madeira à mucosa jugal, quatro (20%) ausência de lago salivar sublingual, dois (19%) com saliva espessa e oito (40%) apresentaram ausência de secreção salivar à estimulação dos Ductos de *Stenon*.

Na segunda avaliação, realizada no período d+8-10, foi observada aderência da espátula de madeira à mucosa jugal em dezesseis dos vinte pacientes (80%), sete (35%) com ausência de lago salivar sublingual, nove (45%) com saliva espessa e também nove (45%) com ausência de secreção salivar à estimulação dos ductos de *Stenon*.

Na coleta realizada no período d+80-100, dos dezessete pacientes avaliados, quinze (88,2%) apresentaram aderência da espátula de madeira à mucosa jugal, quatro (23,5%) ausência de lago salivar sublingual, seis (35,5%) com a saliva espessa e também seis (35,5%) apresentaram ausência de secreção salivar à estimulação dos ductos de *Stenon*.

Quando avaliado o grupo DECH+, não houve correlação estatisticamente significativa com os parâmetros clínicos de hipossalivação (teste exato de *Fisher*). Entretanto, na avaliação longitudinal, a presença de saliva espessa e viscosa mostrou-se significativa (teste de *Kruskal-Wallis*) (tabela 4).

Tabela 4- Avaliação dos parâmetros clínicos de hipossalivação* coletados nos três períodos do estudo

Parâmetros clínicos de hipossalivação	Pré-TCTH	d+8-10	d+80-100	Valor de <i>p</i>
Aderência da espátula de madeira	15 (75%)	16 (80%)	15 (88,2%)	NS
Ausência de lago salivar sublingual	4 (20%)	7 (35%)	4 (23,5%)	NS
Presença de saliva espessa e viscosa	2 (10%)	9 (45%)	6 (35,3%)	<i>p</i> =0,003
Ausência de secreção salivar sob pressão dos ductos da parótida	8 (40%)	9 (45%)	6 (35,3%)	NS
Total	20	20	17	

* Alborghetti *et al.* (2005); *p*<0,05; NS: não significativo

5.2.3. Avaliação do fluxo salivar não estimulado

A média do fluxo salivar não estimulado pré-TCTH foi de 0,573 mL/min para o total de pacientes. No período d+8–10, a média foi de 0,654 mL/min do fluxo não estimulado. Já no terceiro período (d+80-100) a média foi de 0,54 mL/min nos 17 pacientes avaliados. A Figura 8 demonstra a variação do fluxo salivar ao longo dos períodos avaliados neste estudo.

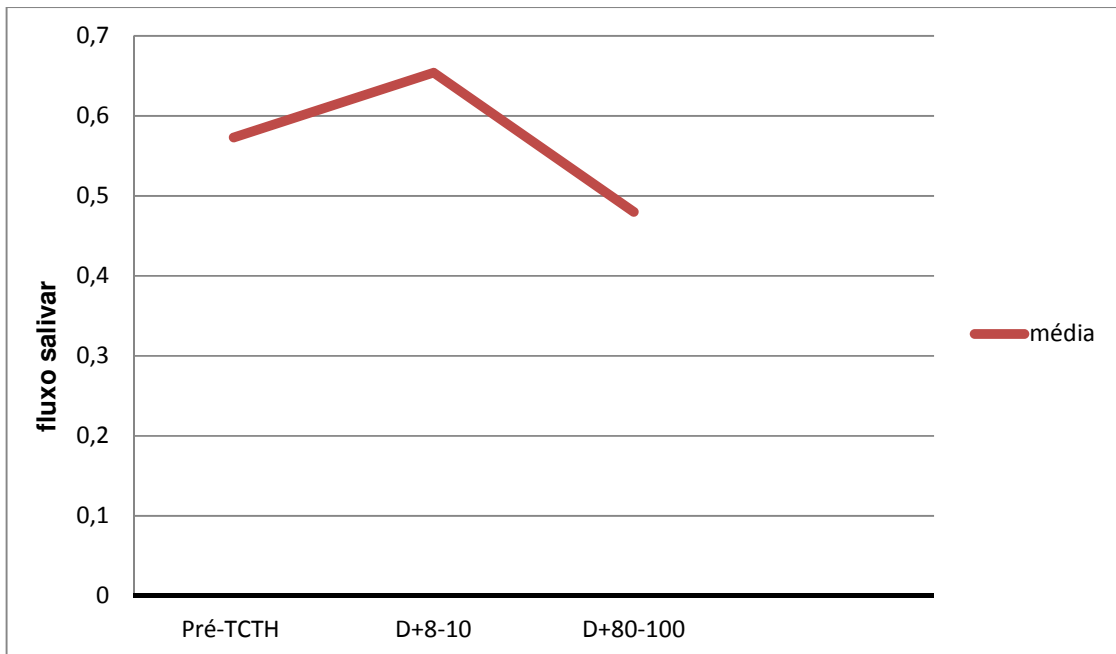


Figura 8- Variação do fluxo salivar (média) nos períodos avaliados nos pacientes incluídos no estudo (n=20)

5.2.4. Característica da Doença do enxerto contra hospedeiro

Dos vinte pacientes estudados, somente três pacientes desenvolveram DECH aguda (DECHa). Dois deles com grau II e um com grau III. Houve envolvimento somente da pele em um paciente e nos demais houve comprometimento do fígado e pele.

Cinco pacientes desenvolveram DECH crônica extensa até a avaliação do d+80-100. Os órgãos/estruturas acometidos foram olhos, boca, trato gastrointestinal (TGI), pele e fígado. Na cavidade bucal, a frequência de lesões liquenóides foi de 43% (n=3), de mucocele foi de 29% (n=2), de lesões ulceradas foi de 14% (n=1) e de eritema 14% (n=1) (Figura 9). Um paciente com diagnóstico de DECH crônica extensa, não apresentou lesão oral característica no momento da avaliação odontológica. Entretanto, estas lesões foram observadas logo após avaliação do d+80-100.

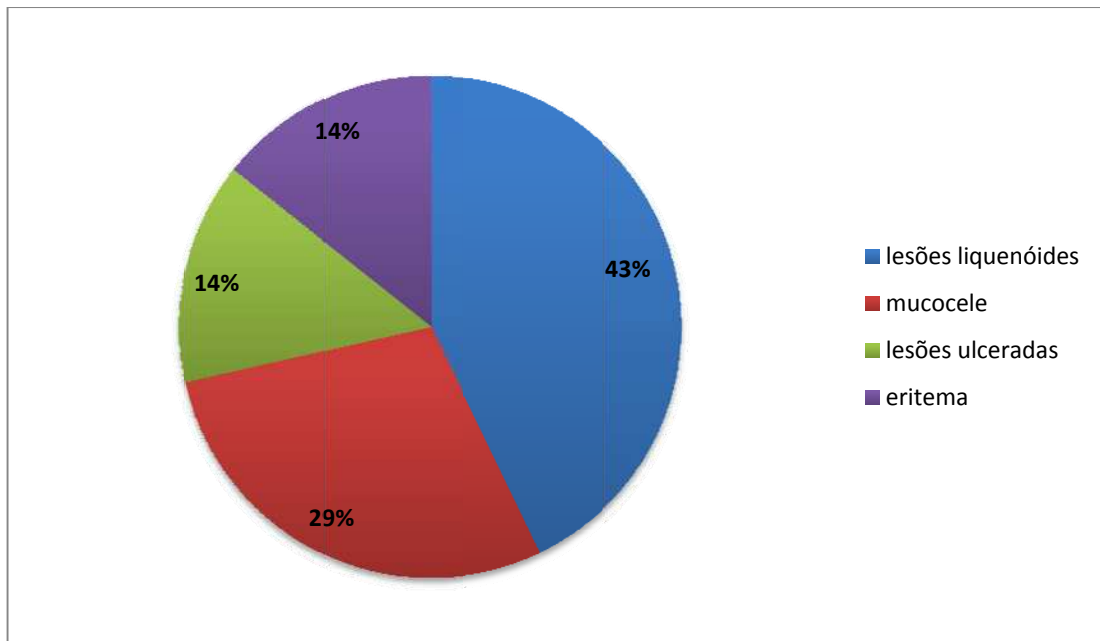


Figura 9- Distribuição das lesões orais nos pacientes que apresentaram a DECHc (n=5)

5.3. Estudo do Proteoma

5.3.1. Identificação do proteoma salivar

As proteínas identificadas neste estudo tiveram os nomes mantidos na língua inglesa, por serem assim reconhecidas nas publicações internacionais.

Foram detectadas 69 proteínas pela espectrometria de massas nas amostras de saliva dos pacientes avaliados nos três períodos do estudo (Tabela 5). As proteínas mais abundantes foram a *alpha-amylase 1* e a *Uncharacterized protein*.

Tabela 5- Proteínas identificadas pelo método de espectrometria de massas na saliva dos pacientes incluídos no estudo (n=69), determinadas em ordem decrescente de quantidade

Proteínas identificadas	Número de acesso IPI
1. <i>Alpha-amylase 1</i>	IPI00300786
2. <i>Uncharacterized protein</i>	IPI00022434
3. <i>cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA</i>	IPI00386879 (+3)
4. <i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>	IPI00004573
5. <i>Uncharacterized protein</i>	IPI00855918 (+2)
6. <i>Cystatin-S</i>	IPI00032294
7. <i>Prolactin-inducible protein</i>	IPI00022974
8. <i>Putative uncharacterized protein</i>	IPI00550731
9. <i>Cystatin-SN</i>	IPI00305477
10. <i>Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B</i>	IPI00023011
11. <i>Zymogen granule protein 16 homolog B</i>	IPI00060800
12. <i>Lipocalin-1</i>	IPI00009650
13. <i>Isoform 1 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein</i>	IPI00099110 (+5)
14. <i>Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196</i>	IPI00423464 (+10)
15. <i>Hemoglobin subunit beta</i>	IPI00654755
16. <i>IGL@ protein</i>	IPI00154742 (+4)
17. <i>Hemoglobin subunit alpha</i>	IPI00410714
18. <i>Immunoglobulin J chain</i>	IPI00178926 (+1)
19. <i>Lysozyme C</i>	IPI00019038
20. <i>Ig alpha-2 chain C region</i>	IPI00641229 (+4)
21. <i>Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1</i>	IPI00296654
22. <i>Uncharacterized protein</i>	IPI00925547
23. <i>cDNA FLJ60163, highly similar to Carbonic anhydrase 6</i>	IPI00295105
24. <i>Serotransferrin</i>	IPI00022463
25. <i>Beta-2-microglobulin</i>	IPI00004656 (+1)
26. <i>Haptoglobin</i>	IPI00641737 (+1)
27. <i>Actin, cytoplasmic 1</i>	IPI00021439 (+2)
28. <i>Protein S100-A9</i>	IPI00027462
29. <i>Histatin-1</i>	IPI00012024
30. <i>Cystatin-SA</i>	IPI00013382
31. <i>Ig mu heavy chain disease protein</i>	IPI00385264 (+2)
32. <i>vitamin D-binding protein isoform 1 precursor</i>	IPI00555812 (+3)

33. <i>Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2</i>	IPI00304557
34. <i>Annexin A1</i>	IPI00218918 (+1)
35. <i>Zinc-alpha-2-glycoprotein</i>	IPI00166729
36. <i>Protein S100-A8</i>	IPI00007047
37. <i>Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin</i>	IPI00553177
38. <i>Cystatin-D</i>	IPI00002851
39. <i>Small proline-rich protein 3</i>	IPI00082931 (+1)
40. <i>Apolipoprotein A-I</i>	IPI00021841
41. <i>Isoform 1 of Kallikrein-1</i>	IPI00304808 (+1)
42. <i>Mucin-7</i>	IPI00152154
43. <i>Alpha-2-macroglobulin</i>	IPI00478003 (+1)
44. <i>UPF0762 protein C6orf58</i>	IPI00374315
45. <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	IPI00219018 (+2)
46. <i>Lactoperoxidase</i>	IPI00025023 (+2)
47. <i>Neutrophil defensin 1</i>	IPI00005721 (+1)
48. <i>Isoform 1 of Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 1</i>	IPI00291410
49. <i>Thioredoxin</i>	IPI00216298
50. <i>Isoform 1 of 14-3-3 protein sigma</i>	IPI00013890
51. <i>Hemopexin</i>	IPI00022488
52. <i>Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain</i>	IPI00021891 (+3)
53. <i>Isoform 1 of WAP four-disulfide core domain protein 2</i>	IPI00291488
54. <i>Hemoglobin subunit delta</i>	IPI00473011
55. <i>Alpha-1-acid glycoprotein 1</i>	IPI00022429
56. <i>Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase</i>	IPI00465248
57. <i>64 kDa protein</i>	IPI00290078 (+2)
58. <i>Profilin-1</i>	IPI00216691
59. <i>Serum amyloid A protein</i>	IPI00552578
60. <i>Ceruloplasmin</i>	IPI00017601
61. <i>Isoform 1 of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>	IPI00299547 (+1)
62. <i>Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)</i>	IPI00399007 (+2)
63. <i>Small proline-rich protein 2B</i>	IPI00017992 (+2)
64. <i>Transcobalamin-1</i>	IPI00299729
65. <i>Cornifin-A</i>	IPI00017987
66. <i>Keratin, type II cytoskeletal 6B</i>	IPI00293665 (+7)
67. <i>Carbonic anhydrase 1</i>	IPI00215983 (+2)
68. <i>Protein S100-A7</i>	IPI00219806
69. <i>Beta-2-glycoprotein 1</i>	IPI00298828 (+1)

De acordo com a função molecular do *Gene Ontology* (GO), as classes de proteínas mais abundantes foram as proteínas de ligação (n= 30; 44%), e de regulação enzimática (n=11; 16%) (Figura 10).

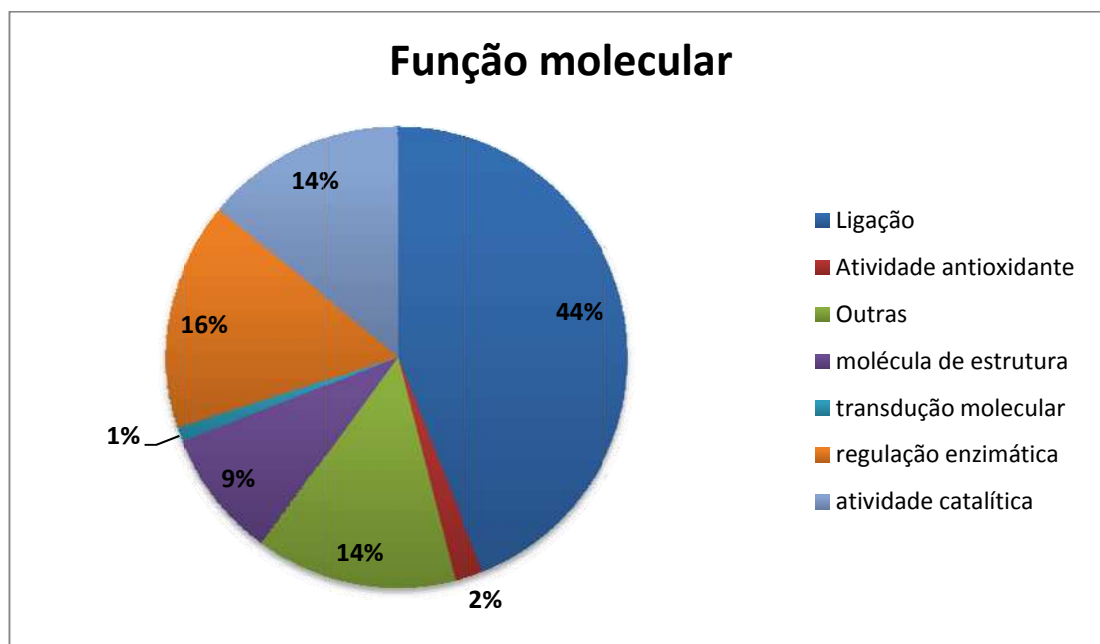


Figura 10- Distribuição das proteínas salivares de acordo com a função molecular definidas pelo *Gene Ontology* (n=69).

O resultado do estudo das proteínas de acordo com o componente celular (GO) está descrito na figura 11. Estas proteínas foram classificadas em onze diferentes grupos e a maioria é do grupo das proteínas extracelulares (n=23; 34%) e de citoplasma (n=8; 12%). O proteoma salivar nestes pacientes apresentou predomínio de proteínas envolvidas em processos celulares (20%) e de regulação (19%) (Figura 12).

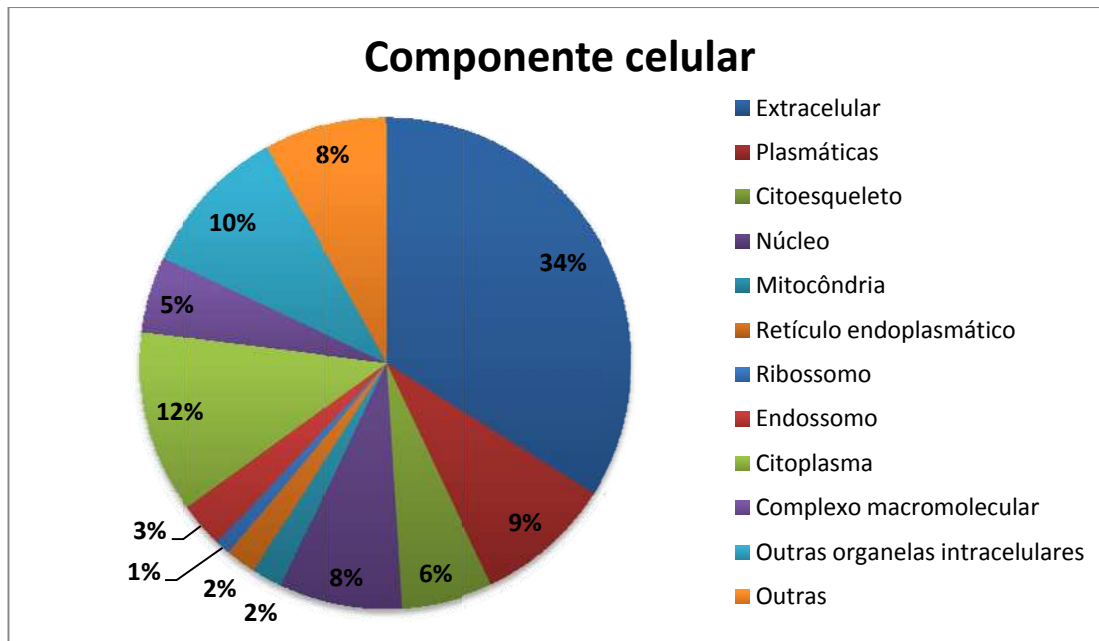


Figura 11- Distribuição do proteoma salivar de acordo com componente celular do GO (n=69)

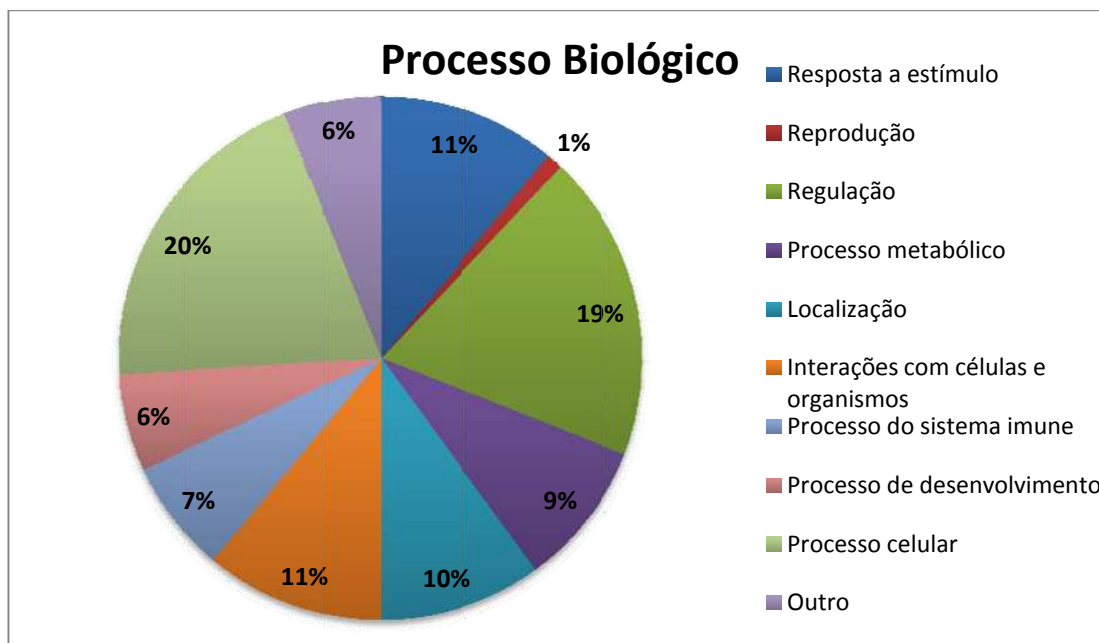


Figura 12- Distribuição do proteoma salivar de acordo com o processo biológico do GO (n=69)

Dessas 69 proteínas identificadas, 29 se mostraram mais frequentes nas amostras dos três períodos avaliados. Desse total, nove (31%) representaram proteínas de imunidade e defesa e oito (20,6%) proteínas de transporte.

5.3.2. Proteínas associadas à Doença do Enxerto contra hospedeiro

As 29 proteínas mais representativas tiveram os seus valores comparados por meio da razão entre o grupo DECH+ e DECH- nos três períodos. A razão estabelecida entre os valores obtidos no d+80-100 pelo d+8-10 mostraram dez proteínas com variação maior que 100% ($\leq 0,5$ e >2) entre estes períodos no grupo DECH+. Esses valores estão representados na tabela 6. As demais dezenove proteínas não apresentaram mudanças significativas.

Dessas dez proteínas, oito apresentaram redução no grupo DECH+: *Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196* (PUP), *Serotransferrin*, *Lactoferrin-B*, *IGL@ protein*, *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B* (SGARP 3B), *Cystatin-SA*, *Cystatin-S*, *Prolactin-inducible protein* (PIP). Somente a proteína *Mucin 5* e *Protein S100-A92* apresentaram-se aumentadas nos pacientes DECH+.

A proteína *Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196* (PUP) apresentou-se com níveis menores no grupo DECH+ no período pré-TCTH (= 3,67), mas quase se igualando ao grupo DECH- no período d+8-10 (=6,48). Entretanto, nota-se uma grande diferença entre os grupos no último período do estudo (d+80-100), quando novamente o grupo DECH+ mostrou níveis menores do que o grupo DECH- (Figura 13).

Tabela 6- Razão entre as médias dos valores das proteínas nos grupos DECH+/DECH- (n=10)

Proteínas	UniProt ID	Razão			
		Pré-TCTH	d+8-10	d+80-100	d+80-100/ d+8-10
<i>Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196</i>	Q6N095	0,365537849	1,106153846	0,094409938	0,085349735
<i>Serotransferrin</i>	P02787	1,46984127	0,989869754	0,368038741	0,371805219
<i>Lactoferrin-B</i>	E7ER44	2,262295082	2,144092219	0,412494039	0,192386333
<i>IGL@ protein</i>	Q8N355	1,418972332	1,383966245	0,49197861	0,355484544
<i>Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B</i>	P02814	0,685981308	1,800735294	0,553162853	0,307187211
<i>Cystatin-SA</i>	P09228	0,618714859	4,571629213	0,581227437	0,127137922
<i>Prolactin-inducible protein</i>	P12273	1,15483871	2,244389027	1,020684169	0,454771502
<i>Cystatin-S</i>	P01036	0,568369028	2,183770883	1,101620029	0,504457697
<i>Mucin 5</i>	Q9HC84	1,144144144	1,049450549	2,967741935	2,827900692
<i>Protein S100-A9</i>	P06702	0,206974128	2,279742765	4,687285223	2,056058822

UniProt ID: identificação da proteína no banco do UniProt de acordo com a sequência

No grupo DECH+ foram encontradas algumas proteínas antimicrobianas com níveis diferenciados: (1) A *Serotransferrin*, que apresentou valores semelhantes entre os dois grupos no período d+8-10 e apresentou uma diminuição em 0,37 vezes no grupo DECH+ entre d+8-10 e d+80-100; (2) A proteína *lactoferrin-B* mostrou-se reduzida em 0,19 vezes no grupo DECH+ entre o período do d+8-10 e o d+80-100; (3) A proteína *PIP* apresentou maiores

níveis neste grupo nos dois primeiros períodos avaliados. Entretanto, mostrou uma diminuição de 0,45 vezes no grupo DECH+ entre d+8-10 e o d+80-100. Estes dados estão distribuídos na tabela 6 e figura 13.

A proteína *IGL@ protein* mostrou um declínio constante no grupo DECH+ durante os períodos avaliados. Enquanto no grupo DECH- no período d+80-100 retornou ao valor inicial do pré-TCTH (=7,48) (figura 13). A redução do nível desta proteína foi de 0,35 vezes no grupo DECH+ entre o período d+8-10 e d+80-100 (tabela 6).

A proteína *SGARP 3B* nos pacientes DECH- apresentou redução no nível no período d+8-10 (=6,8) e este valor continuou quase constante até o d+80-100 (=7,43). No grupo DECH+, houve aumento no período d+8-10 (=12,24), mas mostrou redução no último período, atingindo um valor menor que o inicial (=4,11) (figura 13). A razão entre o grupo DECH+ e DECH- mostrou que houve diminuição da proteína em 0,3 vezes entre o d+8-10 e d+80-100 (tabela 6).

As duas proteínas *Cystatins* identificadas mostraram o mesmo padrão no grupo DECH+, com uma grande elevação do pré-TCTH para o d+8-10. Posteriormente apresentou declínio e atingiu valores próximos ao inicial (Figura 13). A redução observada na *Cystatin SA* foi de 0,12 vezes entre o d+8-10 e d+80-100 no grupo DECH+ quando comparada ao grupo DECH- (tabela 6). Enquanto que a *Cystatin S*, mostrou queda de 0,5 vezes no grupo DECH+ quando comparado ao grupo DECH- durante os dois últimos períodos (tabela 6).

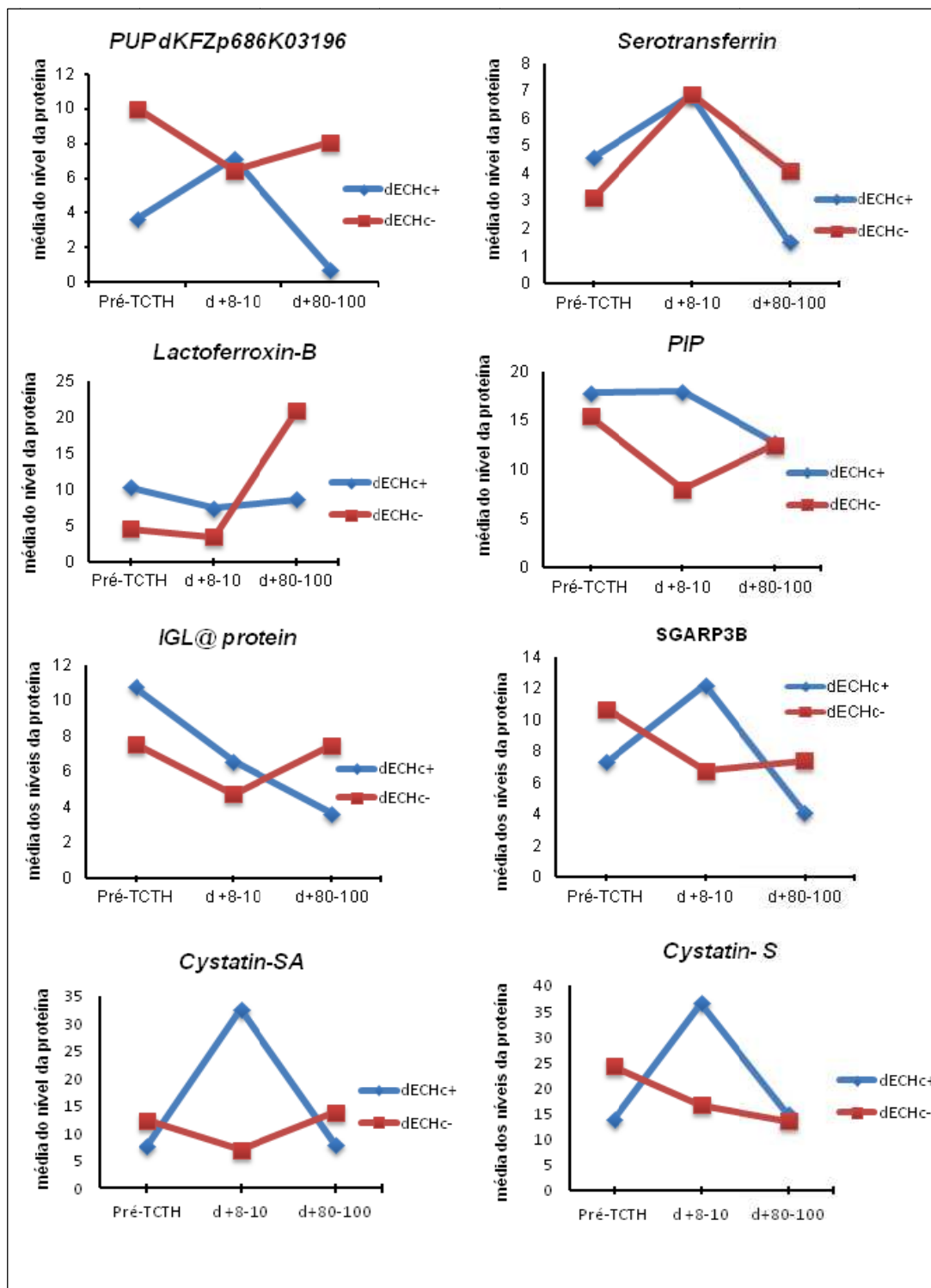


Figura 13- Variação dos níveis das proteínas salivares no grupo DECH+ e DECH- nos períodos avaliados

A proteína *Mucin 5* apresentou um aumento nos pacientes DECH+ em mais de duas vezes entre o d+8-10 e d+80-100 quando comparado ao grupo DECH- (tabela 6). A *Protein S100-A9* teve aumento em duas vezes no grupo DECH+ comparado ao DECH- entre os últimos períodos avaliados (figura 14).

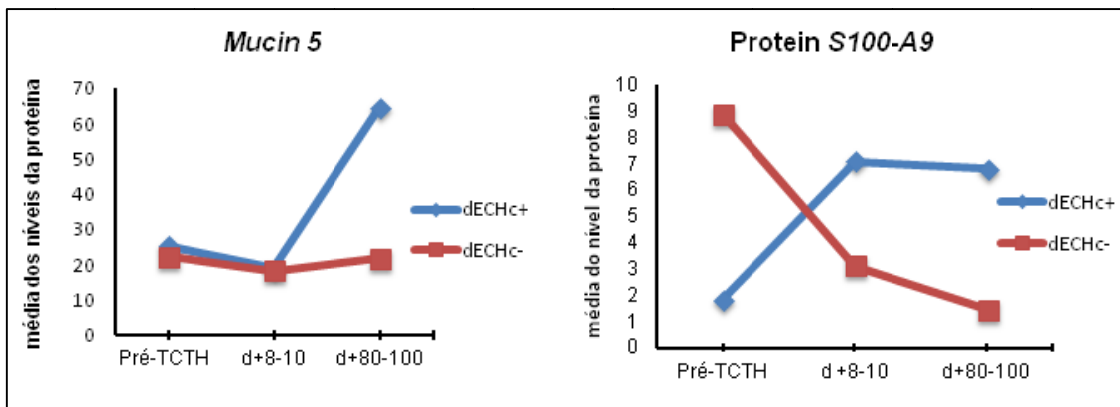


Figura 14- Nível das proteínas que mostraram aumento no grupo DECH+ entre o d+8-10 e d+80-100

Das dez proteínas consideradas alteradas, quatro demonstraram alterações significativas, mas estavam presentes somente em uma amostra de paciente com DECH. Estas proteínas são: *Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196 (PUP)*, *Serotransferrin*, *Mucin 5* e *Protein S100-A92*.

Por isso, as proteínas *Lactoferrin-B*, *IGL@ protein*, *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B*, *Cystatin-SA*, *Prolactin-inducible protein*, *Cystatin-S* foram identificadas como potenciais biomarcadores salivares para a DECH.

6. DISCUSSÃO

Uma grande barreira para a pesquisa e tratamento da DECH é o diagnóstico e prognóstico dependerem quase inteiramente da presença de sintomas clínicos. Atualmente, nenhum teste laboratorial pode prever o risco de desenvolver a DECH, a capacidade de resposta ao tratamento ou a sobrevivência do paciente a doença. Por esta razão, a descoberta de biomarcadores no TCTH pode permitir a identificação de pacientes com alto risco para esta doença ainda no início do transplante, além do reconhecimento daqueles que não respondem ao tratamento tradicional e tenham risco particularmente elevado para a morbidade e mortalidade (Weissinger *et al.*, 2006; 2007; Paczesny, 2013).

Recentemente, a busca por esses marcadores na saliva recebeu uma atenção especial por apresentar uma coleta fácil e não invasiva, mostrando-se como uma alternativa atraente ao sangue. Alguns estudos envolvendo pacientes pós-TCTH relataram expressões alteradas de proteínas ou íons na saliva destes pacientes, porém utilizando metodologias mais simplificadas, como fotometria e sialometria (Nagler *et al.*, 1997; Nagler & Nagler, 2001). As metodologias utilizadas mostraram-se efetivas, porém apresentam limitações, pois exigem grande quantidade de amostra ou são menos abrangentes quando comparadas a espectrometria de massas (EM). Somente dois estudos sobre proteômica salivar de pacientes submetidos ao TCTH utilizando EM foram publicados até o momento (Imanguli *et al.*, 2007; Bassim *et al.*, 2012).

O presente estudo foi longitudinal, prospectivo e utilizou a técnica de espectrometria de massas ESI-Q-TOF para avaliação das proteínas presentes nas amostras de saliva total nos pacientes submetidos ao TCTH durante três períodos do tratamento. Com a utilização desta metodologia, foi possível identificar 69 proteínas durante os períodos coletados. Entretanto existem diferenças

quantitativas do proteoma da saliva entre os diversos estudos já realizados, variando conforme metodologia aplicada, tipo de coleta e preparação das amostras. Guo T *et al* (2006), identificou 1381 proteínas em saliva total de voluntário saudável utilizando a focalização isoeétrica capilar (CIEF-Capillary isoelectric focusing) acoplada a ESI--MS. Enquanto, Siqueira *et al.* (2008) com metodologia semelhante identificou na secreção das glândulas menores de voluntários também saudáveis 56 proteínas.

As proteínas identificadas na maioria das amostras dos pacientes avaliados neste estudo foram de proteínas com função imune e/ou de defesa. Este resultado está de acordo com os observados por Fleissig *et al.* (2009) e Peluso *et al.* (2007) que demonstraram níveis elevados de defensinas na saliva dos pacientes com síndrome de Sjögren, com características clínicas bastante semelhantes à DECHc. Adicionalmente, Rao *et al.* (2009) em um estudo com pacientes diabéticos tipo-2 também observaram resultados semelhantes ao presente estudo, onde várias proteínas de função imune estavam aumentadas na saliva do grupo doente. Pode-se inferir do estudo destes autores que o proteoma salivar ao demonstrar alteração no diabetes pode refletir a condição sistêmica do paciente, portanto de maneira semelhante, a DECH também pode ser avaliada pela composição das proteínas salivares.

Neste estudo, quinze pacientes apresentaram mucosite quando avaliados no período d+8-10. Além disso, a média do fluxo salivar mostrou-se aumentada neste período quando comparada a avaliação pré-TCTH e do d+80-100. Este dado diverge de Eisen *et al.* (1997) que relataram haver uma diminuição do fluxo salivar entre o dia sete e dez pós-transplante pelo regime de condicionamento e também possivelmente pela ingestão de diversas medicações (Eisen *et al.*, 1997). O aumento da média do fluxo salivar relacionado à mucosite no presente estudo pode ser explicado pelo fato dos pacientes terem tido dificuldade na deglutição da saliva, além da presença aumentada do fluido inflamatório que contribui para a composição da saliva total. Apesar deste aumento de fluxo, os parâmetros clínicos

avaliados para hipossalivação estavam presentes em mais pacientes no período da mucosite.

Somente um estudo longitudinal avaliando as mudanças no proteoma salivar pós TCTH está presente na literatura (Imanguli *et al.*, 2007). De maneira semelhante ao estudo de Imanguli *et al.* (2007), no presente estudo as amostras foram coletadas do mesmo paciente antes e após o TCTH, permitindo ter como controle o próprio paciente. No entanto, os períodos de coletas das amostras realizadas neste estudo foram escolhidos de acordo com as manifestações clínicas mais importantes pós TCTH.

Diversos grupos têm se empenhado para desenvolver métodos padronizados para coleta de amostras clínicas para estudos de proteômica nos pacientes com DECH. Padrões de proteômica de soro e urina já foram utilizados na tentativa de diferenciar DECHa de outras complicações pós-TCTH (Kaiser *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2006). No entanto, somente Bassim *et al.* (2012) utilizaram a saliva como amostra pra este fim. Os autores compararam um grupo de cinco pacientes com DECHc oral com um grupo de cinco sem a doença, o que permitiu a identificação de 102 proteínas, sendo 90 delas presentes em níveis reduzidos no grupo com a DECH. Diferentemente do presente estudo, os grupos foram definidos sem padrão de tempo de coleta e não demonstrando o padrão da proteômica anterior ao desenvolvimento da doença.

Imanguli *et al.* (2007) observaram treze proteínas diferentemente expressas nos pacientes um mês após o transplante utilizando a eletroforese 2D e identificaram quatro delas através de MALDI-MS/MS. As proteínas observadas por estes autores foram: lactoferrina, cistatina SN, albumina e amilase salivar. De modo semelhante, o presente estudo também mostrou alterações significativas das duas primeiras proteínas no grupo DECH+ e as proteínas albumina e amilase salivar foram identificadas como as proteínas mais presentes nas amostras de saliva dos três períodos deste estudo. A amilase salivar é uma das proteínas mais

frequentes na saliva, possivelmente por esta razão não se mostrou com alterações significativas no presente estudo. A albumina é uma proteína sanguínea e não produzida pelas glândulas salivares, e geralmente quando encontrada na saliva total é devido à quebra das barreiras naturais orais e periorais, como observado no grupo de pacientes avaliados no presente estudo (Nagler & Nagler, 2001).

A *Serotransferrin* ou *transferrin* é uma proteína responsável pelo transporte de ferro e que apresenta atividade antimicrobiana, além de papel no crescimento e diferenciação celular (Gomme *et al.*, 2005). No presente estudo, esta proteína mostrou-se reduzida nos pacientes DECH+ quando comparado o período d+8-10 com o d+80-100. Estes resultado contrasta com os de Jou *et al.*(2010) que observaram aumento desta proteína nos pacientes com CEC oral, mas ainda assim comprovando seu valor como biomarcador para este câncer em estágios iniciais. Interessante notar, que von Bonsdorff *et al* (2003) demonstraram que níveis séricos normais desta proteína poderiam inibir o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* nos pacientes pós TCTH. Desta maneira, podemos inferir uma possível associação entre a diminuição dos níveis da *serotransferrin* nos pacientes DECH+ com a maior susceptibilidade a infecções.

Os resultados do estudo de Imanguli *et al.* (2007) demonstraram aumento contínuo de *lactoferrin* salivar nos pacientes após o TCTH. De maneira similar, a elevação desta proteína também foi identificada em pacientes com Síndrome de Sjögren (Ryu, 2006) e na parotidite (Tabak *et al.*,1978), refletindo uma possível associação da *lactoferrin* com a presença de infiltrado linfocitário na glândula parótida. Contudo, resultado contrário foi observado neste estudo, que mostrou nível reduzido de *Lactoferrin-B* nos pacientes DECH+ e ausência de correlação com os parâmetros de hipossalivação para este grupo. Pode-se inferir que mesmo com a existência de infiltrado inflamatório nas glândulas salivares maiores dos pacientes DECH+, pode ter havido uma possível recuperação dessas glândulas no período d+80-100. Assim como foi demonstrando por Coracin *et al* (2006) ao avaliarem as glândulas salivares maiores por cintilografia no pré-TCTH, d+30,

d+60 e d+100 e demonstrarem que apesar da alteração glandular presente ocorre uma recuperação funcional no d+100.

A *IGL@ protein* é uma proteína do *locus* lambda das imunoglobulinas exercendo a função de reconhecimento de antígenos e iniciando a resposta imune inata, como a fagocitose e o sistema complemento. Em estudos envolvendo processos inflamatórios como a periodontite (Gonçalves *et al.*, 2010) e a SS (Ryu *et al.*, 2006; Fleissig, 2009), as imunoglobulinas tendem a mostrar aumento na saliva dos grupos com a doença. No entanto, esta proteína apresentou uma redução no grupo DECH+ ao longo do período avaliado neste estudo. Este dado pode ser explicado pela necessidade da ativação do sistema complemento na reação à placa bacteriana, composta de diversos micro-organismos. Enquanto na DECHc observa-se infiltrado inflamatório glandular composto por células linfocitárias, destacando-se as células T CD4 e CD8.

As *cystatins* são inibidores naturais da cisteíno-protease que podem desempenhar função protetora e de regulação durante a inflamação (Gonçalves *et al.*, 2011). Neste estudo algumas das proteínas mais frequentes pertenciam a este grupo como a *Cystatin S*, *Cystatin SA* e *Cystatin SN*. As duas primeiras apresentaram níveis reduzidos no grupo DECH+, enquanto a última não demonstrou alteração significativa. Estes dados corroboram os dados do trabalho de Bassim *et al.* (2012) que também demonstraram níveis reduzidos destas duas proteínas no grupo de pacientes com DECHc oral quando comparado aos pacientes sem a doença. A diminuição destas proteínas na saliva do grupo DECH+ não surpreende, pois a doença também acomete a cavidade oral e seria esperado que a regulação da inflamação estivesse reduzida e a saliva expressasse essa alteração.

A proteína *Prolactin-induced protein* (PIP) é uma glicoproteína encontrada em fluidos e mucosas, apresentando um papel de proteção da mucosa oral através da inibição da colonização ou crescimento bacteriano. Esta proteína tem

sido encontrada em níveis reduzidos nos pacientes com gengivite e periodontite (Haigh *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011). Neste estudo também foi observada a redução desta proteína no grupo DECH+, podendo estar relacionada às manifestações clínicas orais da DECH, principalmente a presença das lesões ulceradas e eritematosas.

A proteína *Mucin 5* é uma das proteínas mais abundantes na saliva e tem função de lubrificação e proteção física dos tecidos orais. Mungia *et al.* (2008) associaram alterações no níveis desta proteína com o aumento da prevalência de cárie. A proteína *Mucin 5* mostrou-se elevada neste estudo no grupo DECH+. Curiosamente, este achado não se mostrou relacionado aos critérios clínicos de hipossalivação utilizados na avaliação deste estudo, como o espessamento e viscosidade da saliva. Entretanto, quando observado os pacientes longitudinalmente, foi observada uma diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da viscosidade e espessamento da saliva. Este achado pode estar associado à falência das glândulas salivares decorrentes do condicionamento utilizado pré-TCTH como já demonstrado por Coracin *et al.* (2006). Além do mais, todos os pacientes deste estudo foram submetidos ao tratamento quimioterápico prévio para a doença de base, o que pode potencializar o resultado encontrado neste estudo.

A proteínas s100 pertencem ao grupo das proteínas de ligação do cálcio que apresentam uma variedade de funções regulatórias, incluindo a regulação da inflamação (Haigh *et al.*, 2010), sendo expressas por neutrófilos, monócitos ativados, macrófagos e queratinócitos. Haigh *et al.* (2010) demonstrou um aumento nos níveis das proteínas S100 na saliva dos pacientes com periodontite. Esse resultado corrobora o observado no presente estudo que demonstrou a proteína S100A9 duas vezes mais aumentada no grupo DECH+. De maneira similar, Mumcu *et al.* (2012) demonstraram aumento desta proteína na saliva de pacientes com doença de *Behçet*, que assim como a DECH, também tem origem

inflamatória e apresenta envolvimento multi-sistêmico, além de ter como característica clínica lesões ulceradas na mucosa oral (Mumcu *et al.*, 2012).

Neste estudo duas proteínas com funções ainda não definidas foram identificadas com alteração significativa no grupo DECH+. A proteína *SGARP 3B* tem uma provável função de promover a angiogênese e estabelecer a microvasculatura (Guo K *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos identificaram esta proteínas como ligante dos lipossacarídeos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Baik *et al.*, 2012) e de *Porphyromonas gingivalis* (Choi *et al.*, 2011), que são importantes fatores de virulência associado com a periodontite agressiva. A *PUP DKFZp686K03196* ainda considerada como proteína não caracterizada, também não apresenta função definida.

A composição salivar e o fluxo podem ser alterados por fatores como a idade, gênero, uso de medicamentos (Nagler & Hershkovich, 2005). Neste contexto, o presente estudo apresenta limitações por não ter estratificado a população de acordo com estes critérios. Adicionalmente, por ter sido um estudo longitudinal e prospectivo até o d+100 pós TCTH, o grupo que apresentou DECH foi um grupo reduzido e quatro das proteínas consideradas alteradas para a doença só estavam presentes em uma amostra.

Estudos futuros são necessários para que o painel de proteínas identificadas como potenciais biomarcadores para a DECH seja confirmado pela inclusão de novas amostras. Assim como, a validação destas proteínas alteradas deverá ser realizada através de técnicas utilizando anticorpos como *Western Blot* e *ELISA* ou mesmo através da própria espectrometria de massas utilizando quantificação livre de marcadores (label-free quantitation).

7- CONCLUSÃO

- 1- Foi encontrado um painel com 69 proteínas salivares nos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. As proteínas mais frequentes foram relacionadas à defesa e imunidade.
- 2- Foram descritas dez proteínas que sem mostraram alteradas no grupo com doença do enxerto contra hospedeiro: *Putative uncharacterized protein DKFZp686K03196*, *Serotransferrin*, *Lactoferrin-B*, *IGL@ protein*, *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (SGARP 3B)*, *Cystatin-SA*, *Cystatin-S*, *Prolactin-inducible protein (PIP)*, *Mucin-5* e *S100A9*.
- 3- Seis proteínas foram identificadas como potenciais biomarcadores para a DECH: *Lactoferrin-B*, *IGL@ protein*, *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (SGARP 3B)*, *Cystatin-SA*, *Cystatin-S* e *Prolactin-inducible protein (PIP)*.

REFERÊNCIAS

Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(1): 1-9.

Amado FM, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem.* 2012 Oct 25. pii: S0009-9120(12)00579-6.[Epub ahead of print].

Ardrey RE. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction.* Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000; 25(1): 25-9.

Baik JE, Hong SW, Choi S, Jeon JH, Park OJ, Cho K *et al.* Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol.* 2012 Oct 31.[Epub ahead of print].

Bassim CW, Ambatipudi KS, Mays JW, Edwards DA, Swatkoski S, Fassil H *et al.* Quantitative Salivary Proteomic Differences in Oral Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Clin Immunol.* 2012; 32(6):1390-9.

Bigler LR, Streckfus CF, Dubinsky WP. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. *Clin Lab Med.* 2009; 29(1): 71-85.

Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966-1967; 62: 21-78.

Blijlevens NM, Donnelly JP, De Pauw BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(12): 1269-78.

Boja E, Hiltke T, Rivers R, Kinsinger C, Rahbar A, Mesri M *et al.* Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *Proteome Res.* 2011;10(1):66-84.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7(72): 248-54.

Choi S, Baik JE, Jeon JH, Cho K, Seo DG, Kum KY *et al.* Identification of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-binding proteins in human saliva. *Mol Immunol.* 2011; 48(15-16): 2207-13.

Choi SW, Levine JE, Ferrara JL. Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010; 30(1): 75-101.

Colnago LA, Almeida FCL, Valente AP. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: revolução no estudos das macromoléculas biológicas. *QNEsc.* 2002; 16. [acesso 2012 Fev 7] Disponível em: http://qnesc.sbg.org.br/online/qnesc16/v16_A04.pdf

Coracin FL, Pizzigatti Correa ME, Camargo EE, Peterson DE, de Oliveira Santos A, Vigorito AC *et al.* Major salivary gland damage in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation assessed by scintigraphic methods. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37(10): 955-9.

Cunha RB, Castro MS, Fontes W. Espectrometria de massa de proteínas. *Biociência* 2006; 36(9):40-46.

Davies AN, Broadley K, Beighton D. Salivary gland hypofunction in patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 2002; 38(7): 680-5.

Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M *et al.* The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res.* 2008; 7(5): 1994-2006.

Eisen D, Essell J, Broun ER. Oral cavity complications of bone marrow transplantation. *Semin Cutan Med Surg.* 1997; 16(4): 265-72.

Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(1): 39-44.

Ferraccioli G, De Santis M, Peluso G, Inzitari R, Fanali C, Bosello SL *et al.* Proteomic approaches to Sjögren's syndrome: a clue to interpret the pathophysiology and organ involvement of the disease. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(9): 622-6.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009; 373(9674): 1550-61.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(12): 945-56.

Filipovich AH. Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(2): 251-7.

Fleissig Y, Deutsch O, Reichenberg E, Redlich M, Zaks B, Palmon A *et al.* Different proteomic protein patterns in saliva of Sjögren's syndrome patients. *Oral Dis.* 2009; 15(1): 61-8.

Giusti L, Baldini C, Bazzichi L, Ciregia F, Tonazzini I, Mascia G *et al.* A. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases--the example of Sjögren's syndrome. *Proteomics.* 2007; 7(10):1634-43.

Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol.* 2001;29(3): 259-77.

Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today.* 2005; 10(4): 267-73.

Gonçalves L da R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G *et al.* Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Proteomics.* 2010; 73(7): 1334-41.

Gonçalves L da R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, Domont G *et al.* Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; 46(5): 599-606.

Guo K, Li J, Wang H, Osato M, Tang JP, Quah SY *et al.* PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2006; 66(19):9625-35.

Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with esi-tandemms. *J Proteome Res* 2006; 5: 1469–78.

Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JRK, Barnett MPG, Smolenski GA, Wheeler TT. Alterations in the salivary proteome associated with periodontitis. *J Clin Periodontol.*2010; 37: 241–247.

Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007a;1098:323-9.

Hu S, Vissink A, Arellano M, Roozendaal C, Zhou H, Kallenberg CG *et al.* Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjögren's syndrome using protein microarrays. *Proteomics.* 2011; 11(8): 1499-507.

Hu S, Yu T, Xie Y, Yang Y, Li Y, Zhou X *et al.* Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007b; 4(2): 55-64.

Imanguli MM, Alevizos I, Brown R, Pavletic SZ, Atkinson JC. Oral graft-versus-host disease. *Oral Dis.* 2008; 14(5): 396-412.

Imanguli MM, Atkinson JC, Harvey KE, Hoehn GT, Ryu OH, Wu T *et al.* Changes in salivary proteome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2007; 35(2): 184-92.

Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, Chen SY, Tsai MH, Huang SH, Lin CW. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal Chim Acta.* 2010; 681(1-2): 41-8.

Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E, Ganser A *et al.* Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2004; 104(2): 340-9.

Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the

Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(Database issue):D204-10.

Mumcu G, Cimilli H, Karacayli U, Inanc N, Ture-Ozdemir F, Eksioglu-Demiralp E *et al.* Salivary levels of antimicrobial peptides Hnp 1-3, LI-37 and S100 in Behcet's disease. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(6): 642-6.

Mungia R, Cano SM, Johnson DA, Dang H, Brown JP. Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging Clin Exp Res.* 2008; 20(6): 503-8.

Nagler A, Nagler R, Ackerstein A, Levi S, Marmary Y. Major salivary gland dysfunction in patients with hematological malignancies receiving interleukin-2-based immunotherapy post-autologous blood stem cell transplantation (ABSCT). *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20(7): 575-80.

Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(13): 3979-84.

Nagler R, Marmary Y, Krausz Y, Chisin R, Markitziu A, Nagler A. Major salivary gland dysfunction in human acute and chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Bone Marrow Transplant.* 1996a; 17:219-224.

Nagler RM, Laufer D, Nagler A. Parotid gland dysfunction in an animal model of chronic graft-versus-host disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996b; 122:1057-1060.

Nagler RM, Nagler A. The effect of pilocarpine on saliva constituents in patients with chronic graft-versus-host disease. *Arch Oral Biol.* 2001; 46:689-695.

Nagler RM. Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis. *Oral Oncol.* 2009; 45(12): 1006-10.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organization; 1979.

Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R *et al.* A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2009; 113(2): 273-8.

Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood.* 2013; 121(4): 585-94.

Peluso G, De Santis M, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Messana I *et al.* Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjögren's syndrome before and after pilocarpine treatment. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(7): 2216-22.

Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E *et al.* Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res.* 2009; 8(1): 239-45.

Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15(1 Suppl):162-8.

Rudney JD, Staikov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(1):91-100.

Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser

desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology*. 2006; 45(9): 1077-86.

Salvato F, Carvalho MCCG. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural* *Ciência Rural*, v.40, n.3, mar, 2010.
Siqueira WL, Salih E, Wan DL, Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J Dent Res*. 2008; 87(5): 445-50.

Schubert MM, Correa ME. Oral graft-versus-host disease. *Dent Clin North Am*. 2008; 52(1): 79-109.

Siqueira WL, Salih E, Wan DL, Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J Dent Res*. 2008; 87(5): 445-50.

Srinivasan R, Daniels J, Fusaro V, Lundqvist A, Killian JK, Geho D *et al*. Accurate diagnosis of acute graft-versus-host disease using serum proteomic pattern analysis. *Exp Hematol*. 2006; 34(6): 796-801.

Streckfus CF, Dubinsky WP. Proteomic analysis of saliva for cancer diagnosis. *Expert Rev Proteomics*. 2007 Jun; 4(3): 329-32.

Tabak L, Mandel ID, Karlan D, Baumash H. Alterations in lactoferrin in salivary gland disease. *J Dent Res*. 1978; 57: 43-7.

Tyers M.; Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*; 422(6928): 193-197: 2003 [acesso 2010 jan 11]. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v422/n6928/full/nature01510.html>.

Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*. 2003; 54:29-52.

von Bonsdorff L, Sahlstedt L, Ebeling F, Ruutu T, Parkkinen J. Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 37(1): 45-51.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR *et al*. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995; 16(7): 1090-4.

Weissinger EM, Mischak H, Ganser A, Hertenstein B. Value of proteomics applied to the follow-up in stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2006; 85(4): 205-11.

Weissinger EM, Schiffer E, Hertenstein B, Ferrara JL, Holler E, Stadler M *et al*. Proteomic patterns predict acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 109(12): 5511-9.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF *et al*. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996; 13: 19-50.

Xie H, Rhodus NL, Griffin RJ, Carlis JV, Griffin TJ. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4(11): 1826-30.

Yang LL, Liu XQ, Liu W, Cheng B, Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res*. 2006; 55(10): 405-7.

Zhang A, Sun H, Wang P, Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. *Clin Chim Acta*. 2012;415C: 261-265.

ANEXO I - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 18/01/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1297/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1028.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS ORAIS E DA PROETÔMICA SALIVAR EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO-HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patrícia do Socorro Queiroz Feio

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 16/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/01/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Identificar prospectivamente a presença e possíveis variações de proteínas excretadas na saliva em pacientes submetidos ao transplante de células hematopoiéticas que desenvolveram ou não a DECH oral, e correlacioná-las as manifestações clínicas orais apresentadas no momento da coleta da saliva. Relacionar a saúde oral com a qualidade de vida destes pacientes.

III - SUMÁRIO

Estudo longitudinal, prospectivo composto por 30 pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos, com indicação de transplante de medula óssea. Será aplicado o questionário OHIP-49 para avaliação da influência oral na qualidade de vida. O questionário será aplicado pré-transplante e após 1 ano do TCTH. Todos os pacientes serão submetidos a um exame clínico odontológico de rotina. Será coletada amostra de saliva não estimulada ante do TCTH, após o TCTH, no momento do diagnóstico da DECH oral aguda ou DECH oral crônica, entre os dias 80 e 100 e no momento do término do tratamento imunossupressor para a DECH. No caso do paciente não desenvolver DECH, no primeiro e segundo ano. As proteínas serão avaliadas por espectrometria de massa.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO II- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, autorizo a Cirurgiã Dentista *Patricia do Socorro Queiroz Feior*, portadora do CRO-PA 3917, pertencente à equipe odontológica do Hemocentro/Unicamp, a realizar em mim as avaliações da pesquisa “AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DA PROTEÔMICA SALIVAR DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO”. Foram discutidos comigo os detalhes da pesquisa, que incluem exame clínico da minha boca para avaliação de sinais clínicos da doença do enxerto contra o hospedeiro e coleta salivar. Serão realizadas comigo avaliações odontológicas periódicas pré- transplante e em mais cinco diferentes períodos após o transplante.

1. *Avaliação do grau de mucosite*: Foi explicado que as avaliações serão feitas por um dentista da equipe de Odontologia do Hemocentro da Unicamp no D+ 10 durante o período de internação do transplante.

2. *Coleta de saliva*: Para as coletas das amostras salivares foi explicado que deverei cuspir toda a minha saliva da boca a cada 30 segundos até completar o tempo de 5 minutos em um recipiente descartável de plástico, após um intervalo mínimo de uma hora da minha última refeição ou minha última higiene bucal, na posição sentada. Esse exame será realizado comigo nos períodos pré e pós-transplante. Estou ciente que a minha saliva será utilizada para avaliação e quantificação das proteínas presnetes na minha saliva.

Desconfortos, riscos previsíveis e benefícios esperados: Estou ciente que os procedimentos aos quais serei submetido, o de coleta de saliva, não apresenta riscos à minha saúde. Fui informado que a coleta de saliva será feita em um local privado, preservando assim a minha privacidade, não incorrendo riscos de constrangimento. Fui informado também, que não haverá benefícios financeiros relacionados à minha participação no estudo.

Ressarcimento e indenização: Não há gastos previstos pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de ressarcimento pelos gastos referentes ao seu deslocamento tendo em vista que os indivíduos serão avaliados no mesmo dia e período segundo o agendamento de sua consulta. Não há riscos previsíveis pela participação na pesquisa e, portanto, não há previsão de indenização. Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Todas as minhas perguntas sobre a pesquisa foram respondidas, não tendo ficado nenhuma dúvida. Essas avaliações serão feitas sem qualquer custo para mim. Terei total liberdade de retirar minha autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, conforme determinação da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde sem prejudicar a continuação do meu tratamento. Fui avisado da possibilidade de armazenamento do material biológico para estudos futuros, desde que aprovados pelo CEP, e com a minha permissão, assinalada, no presente documento, de acordo com as normas da Resolução 347/2005.

Autoriza o armazenamento do material biológico coletado (sangue, urina, saliva e /ou biópsia)?

SIM NÃO

Serei informado sobre os resultados dos exames, sendo mantido sigilo sobre a minha identidade quando forem expostas e publicadas as conclusões da pesquisa.

Campinas, ____/____/____

Ciente: _____

Testemunha: 1. _____ RG: _____

Responsável: Aluna: Patricia do Socorro Queiroz Feio – Fone: (19) 321065315

Orientador: Dr. Maria Elvira Pizzigatti Corrêa– Fone: (19) 3788 8729

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM - UNICAMP. Endereço –Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo- Campinas – São Paulo – Brasil Caixa postal - 611 - CEP - 13083-970 - Fone: 3788-8936.

Ausência de secreção de saliva sobre pressão dos ductos				
Queixa de Xerostomia				

Avaliação "B" (Mucosite: D +8 a D +10)

QUESTIONÁRIO

Paciente No. _____ Data: ____/____/____

Iniciais do Paciente: _____ Data de nascimento (____/____/____) Idade: (____)

História da doença atual (queixa principal e duração): _____

Uso de medicamentos de rotina? S N

Quais? _____

AVALIAÇÃO CLÍNICA ORAL: Exame da cavidade Oral

Índice de Placa

0 - sem placa; 1 - placa detectada por sondagem; 2 - placa visível; 3 - placa espessa (+ 1mm); X - dente ausente

	16			12				24				36			32				44	

Avaliação Gengival

0 - gengiva normal; 1 - gengiva com inflamação leve; 2 - gengiva com inflamação moderada; 3 - gengiva com inflamação severa; X - dente ausente

	16			12				24				36			32				44	

Avaliação Dentária

0- Hígido; 1- Cariado; 2- Restaurado com cárie; 3- Restaurado sem cárie; 4- Ausente por cárie; 5- Pilar prótese

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28					
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38					

CPOD: _____

Exame Clínico Bucal - Variações da Normalidade e Lesões Secundárias

Lesão : S N

Descrição da lesão: _____

Localização: _____

AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR

Valor Peso Inicial _____ g (-) Valor Peso Final _____ g (/5) = Valor obtido: _____ ml/min.

AVALIAÇÃO DE HIPOSALIVAÇÃO

Parâmetros clínicos	Pré- TctH	NADIR	Diag. GVHD D+ 80-100	Imunossupressão
Aderência da espátula à mucosa				
Ausência de lago sublingual				
Saliva espessa e viscosa				
Ausência de secreção de saliva sobre pressão dos ductos				
Queixa de Xerostomia				

Avaliação da Mucosite - (OMS):

Graus da Mucosite:

- 0 - Ausência de sintomatologia.
- 1 - Boca inflamada e sensível, sem úlceras.
- 2 - Boca inflamada e sensível com úlceras, mas capaz de comer normalmente.
- 3 - Somente com dieta líquida.
- 4 - Incapaz de comer e beber.



Conduta

Avaliação "C" (Pós Transplante: D +80 a D +100)

QUESTIONÁRIO

Paciente No. _____ Data: ____/____/____

Iniciais do Paciente: _____ Data de nascimento (____/____/____) Idade: (____)

História da doença atual (queixa principal e duração): _____

Uso de medicamentos de rotina? S N

Quais? _____

AVALIAÇÃO CLÍNICA ORAL: Exame da cavidade Oral

Índice de Placa

0 - sem placa; 1 - placa detectada por sondagem; 2 - placa visível; 3 - placa espessa (+ 1mm); X - dente ausente

	16			12			24			36			32		44

Avaliação Gengival

0 - gengiva normal; 1 - gengiva com inflamação leve; 2 - gengiva com inflamação moderada; 3 - gengiva com inflamação severa; X - dente ausente

	16			12			24			36			32		44

Avaliação Dentária

0- Hígido; 1- Cariado; 2- Restaurado com cárie; 3- Restaurado sem cárie; 4- Ausente por cárie; 5- Pilar prótese

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

CPOD: _____

Exame Clínico Bucal - Variações da Normalidade e Lesões Secundárias

Lesão : S N

Descrição da lesão: _____

Localização: _____

AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR

Valor Peso Inicial _____ g (-) Valor Peso Final _____ g (/5) = Valor obtido: _____ ml/min.

AVALIAÇÃO DE HIPOSALIVAÇÃO

Parâmetros clínicos	Pré- TctH	NADIR	Diag. GVHD D+ 80-100	Imunossupressão
Aderência da espátula à mucosa				
Ausência de lago sublingual				
Saliva espessa e viscosa				
Ausência de secreção de saliva sobre pressão dos ductos				
Queixa de Xerostomia				

AVALIAÇÃO DE DOENÇA DO ENXERTO (DECH)

Lesão : S N

Descrição da lesão: _____

DURAÇÃO: ____ dia(s) semana(s) mês(es) ano(s) Desconhecida

TAMANHO: Sem lesão visível Variável Largura/diâmetro: _____ X _____ cm

LESÃO: nódulo pápula placa mancha vesícula bolha erosão fenda/fissura úlcera **SENSIBILIDADE:** Normal

Discretamente dolorida Dolorida Parestesia;

COR: rósea/Normal Arroxeadas Esbranquiçada Enegrecida Avermelhada

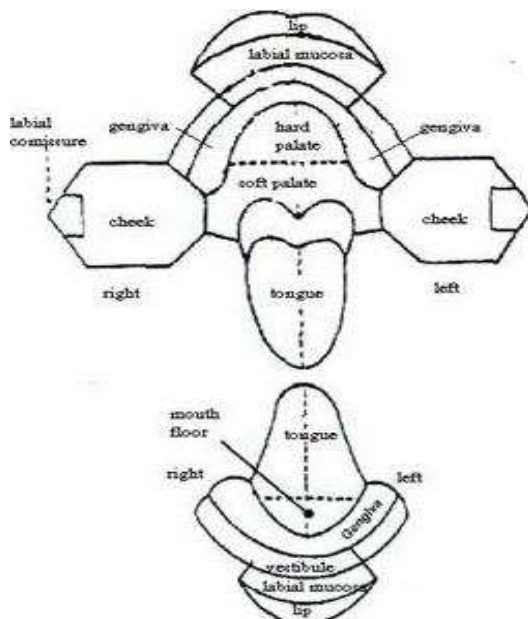
LIMITES: Nítido Difuso; LATERALIDADE: Direita Esquerda Mediana Bilateral Simétrica
 Dupla Múltipla Generalizada
 LOCALIZAÇÃO: _____

NÚMERO: Única

EXAME CLÍNICO-FOTOS

BIÓPSIA – biopsiar lesões brancas em mucosa e glândulas salivares (pelo menos 6)

		0	1	2	3
Pontuação - Boca		<input type="checkbox"/> Sem sintomas	<input type="checkbox"/> Sintomas leves com sinais da doença, mas sem limitação significativa para a ingestão oral	<input type="checkbox"/> Sintomas moderados com sinais da doença com limitação parcial da ingestão	<input type="checkbox"/> Sintomas graves com sinais da doença ao exame com limitação maior da ingestão oral
Boca	Eritema	<input type="checkbox"/> Sem	Eritema leve ou moderado (<25% da boca)	<input type="checkbox"/> Moderado (≥25% da boca) ou Eritema grave (<25% da boca)	<input type="checkbox"/> Eritema grave (≥25%)
	Liquenóide	<input type="checkbox"/> Sem	<input type="checkbox"/> Alterações Hiperqueratóticas (<25% da boca)	<input type="checkbox"/> Alterações Hiperqueratóticas (25-50% da boca)	<input type="checkbox"/> Alterações Hiperqueratóticas (>50% da boca)
	Úlceras	<input type="checkbox"/> Sem	<input type="checkbox"/> sem	<input type="checkbox"/> Úlceras ≤20%	<input type="checkbox"/> Ulcerações graves (>20%)
	Mucoceles (somente lábio inferior e palato mole)	<input type="checkbox"/> Sem	<input type="checkbox"/> 1-5 mucoceles	<input type="checkbox"/> 6-10 mucoceles	<input type="checkbox"/> > 10 mucoceles
Dor na Boca		<input type="checkbox"/> Sem sintomas	<input type="checkbox"/> Sensibilidade a alimento	<input type="checkbox"/> Dor que necessita de narcóticos	<input type="checkbox"/> Incapaz de comer



I – Avaliação da maior lesão ulcerada inicial gentinela (S):

___ X ___ cm (marcar a localização anatômica no desenho)

II – Outra nova úlcera(s) desde a última avaliação (O)?

Sim: A maior lesão ulcerada (O) de ___ X ___ cm Não

Como Calcular os 100% da area da cavidade bucal:

- 40% include:
 - lábios (“vermillion lips”)
 - mucosa labial
 - mucosa bucal
- 40% include:
 - língua
- 20% include:
 - palato (mole e duro)

Mucosal change	No evidence of cGvHD		Mild		Moderate		Severe	
	None	0		1		2		3
Erythema	None	0	Mild erythema or moderate erythema (< 25%)	1	Moderate (≥ 25%) or severe erythema (< 25%)	2	Severe erythema (≥ 25%)	3
Lichenoid	None	0	Hyperkeratotic changes (< 25%)	1	Hyperkeratotic changes (25%–50%)	2	Hyperkeratotic changes (> 50%)	3
Ulcers	None	0	None	0	Ulcers involving ≤ 20%	3	Severe ulcerations (> 20%)	6
Mucocelles*	None	0	1-5 mucocelles	1	6–10 scattered mucocelles	2	Over 10 mucocelles	3
			*Mucocelles scored for lower labial and soft palate only					
							Total score for all mucosal changes	

Mucosal change	No evidence of cGvHD		Mild		Moderate		Severe	
	None							
Erythema	None		Mild erythema or moderate erythema (< 25%)		Moderate (≥ 25%) or severe erythema (< 25%)		Severe erythema (≥ 25%)	
Lichenoid	None		Hyperkeratotic changes (< 25%)		Hyperkeratotic changes (25%–50%)		Hyperkeratotic changes (> 50%)	
Ulcers	None		None		Ulcers involving ≤ 20%		Severe ulcerations (> 20%)	
Mucocelles*	None		1-5 mucocelles		6–10 scattered mucocelles		Over 10 mucocelles	
			*Mucocelles scored for lower labial and soft palate only					
							Total score for all mucosal changes	

FORMULARIO MÉDICO DO ESTUDO

Data da Visita _____

Paciente: _____

Nº do Prontuário: _____

Data do Diagnóstico inicial da DECHc: _____

Tipo do DECHc: _____

No início do diagnóstico da DECHc: **Progressiva** **Interrupta** **De Novo**

– **Plaquetas abaixo 100,000 ul:** **Sim** **Não**

– **Eosinófilos acima 500 ul:** **Sim** **Não** critério do NIH:

– **Recebendo esteroide:** **Não**

<0.5 mg/kg/dia

≥ 0.5 – 1 mg/kg/d

> 1 mg/kg/dia

Conduta
