

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ANDRESA BORGES SOARES

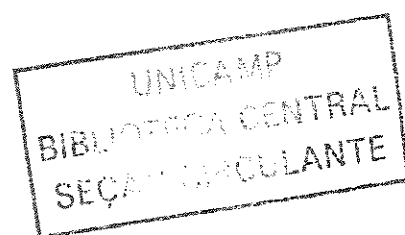
Cirurgiã - Dentista

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE
GVHDc EM GLÂNDULAS SALIVARES MENORES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do **TÍTULO DE MESTRE EM ESTOMATOPATOLOGIA**, com área de concentração em **PATOLOGIA**

PIRACICABA-SP

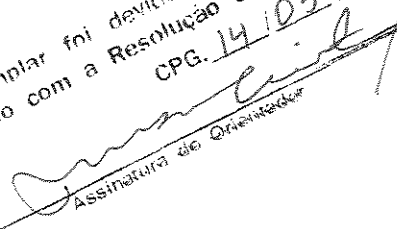
2003



ANDRESA BORGES SOARES
Cirurgiã - Dentista

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE
GVHDc EM GLÂNDULAS SALIVARES MENORES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do **TÍTULO DE MESTRE EM ESTOMATOPATOLOGIA**, com área de concentração em **PATOLOGIA**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/53
CPG. 14/05/2003

Assinatura do Orientador

Orientadora: Prof. Dra. Maria Leticia Cintra

Co-orientador: Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Prof. Dra. Maria Leticia Cintra

PIRACICABA-SP

2003

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	5011a
V	EX
TOMBO BC/	65177
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/08/03
Nº CPD	

CM00186919-1

BIBID 297100

Ficha Catalográfica

Soll a Soares, Andresa Borges.
Avaliação clínica, histológica e imunoistoquímica de GVHDc em glândulas salivares menores. / Andresa Borges Soares. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xix, 115p. : il.

Orientadora : Profª Drª Maria Letícia Cintra.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Histopatologia. 2. Mucosa bucal. I. Cintra, Maria Letícia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata ANDRESA BORGES SOARES aprovada.

1. Profa. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA

2. Prof. Dr. ADRIANO MOTA LOYOLA

3. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dedicatória

A Deus ...

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará.

Em verdes pastagens me faz repousar,

*Para fontes seguras me conduz e restaura as
minhas forças.*

*Ele me guia por bons caminhos, por causa do
Seu Nome.*

*Mesmo que eu caminhe pelo vale das sombras,
nenhum mal temerei, pois junto a mim estás.*

Teu bastão e teu cajado me deixam tranqüilo.”

Salmo 23

*Aos meus queridos e amados pais, Luiz e
Teresinha, por serem o que tenho de mais valioso
na vida. Pelo imenso amor, incentivo e
compreensão dedicados em toda a minha vida.
Agradeço a vocês tudo que sou e tudo que tenho
conquistado.*

Às minhas queridas e amadas irmãs, por todo carinho, amor, paciência e amizade dedicados em todos os momentos da minha vida. À Anadelfia por ser o meu exemplo de coragem, força e dedicação. À Cristiane, que com sua meiguice, ternura e companheirismo enchem meu coração de amor.

À Paulo Faria, por todos os ensinamentos, carinho, paciência, apoio e incentivo dedicados a minha pessoa. Sem você a realização desse sonho seria impossível.

Agradecimentos Especiais

*À Prof. Dra. Maria Leticia Cintra, pela
confiança depositada em minha pessoa e pela
oportunidade da realização deste trabalho.
Obrigada por todos os ensinamentos e
carinho*

*À minha "irmãzinha" Claudia, por compartilhar
todos os momentos da minha vida, sempre me
apoando, me incentivando e nunca deixando eu
desistir de lutar. Obrigada por estar sempre ao
meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos Profs. do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP pelos ensinamentos.

À Prof. Dra. Simone Maria Galvão de Sousa, por acreditar em mim e me ensinar os primeiros passos rumo a pesquisa e o ensino. Além de ser um exemplo de professora, pesquisadora, mulher e amiga.

Ào Prof. Dr. Mario Fernando de Goes, por ser um exemplo de pesquisador e docente, e por estar sempre torcendo por mim

Aos meus queridos amigos Adriana Kono, Alexandre Higo, Ana Paula Bilches, Fabiane Bertoluce, Gustavo Achoa e Juliano Milanezi, por acompanharem comigo todos os meus sonhos e conquistas, sempre me dando apoio, incentivo, carinho e demonstrando o verdadeiro sentido da amizade. Em cada conquista minha haverá um pouco de cada um de vocês.

À família Camolesi, por representar a minha família em Piracicaba. Obrigada por todo carinho e recepção dedicado a minha pessoa.

Aos amigos de turma de mestrado: Eduardo, Fábio Ito, Fábio Ornelas, Francisco, Lucinei, Luciana e Silvia, pela amizade, convívio e conhecimentos trocados durante o curso. Em especial ao Ademar por ter demonstrado ser um verdadeiro amigo e companheiro nos momentos mais difíceis.

Aos amigos de pós-graduação: Ana Lúcia, Cláudio, Danyel, Dawton, Estela, Jorge, Juliana, Junior, Karina Zecchin, Karina Neves, Marcelo, Michele Agostin, Michele Pereira, Paola, Paulo Bonan, Paulo Faria e Sabrina, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

Aos funcionários da Área de Patologia, pelo convívio e auxílio. Em especial à Ana Cristina, pela colaboração fundamental na parte experimental deste trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magno, pela excelente realização da análise estatística.

Aos professores e funcionários do departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas de Campinas-UNICAMP, pela colaboração na utilização dos recursos do Departamento.

A Maria Elvira e a todos os médicos e funcionários do Hemocentro-UNICAMP. Em especial a funcionária Sonia, por toda ajuda, carinho e atenção dedicado a minha pessoa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A TODOS OS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

“A vida não é um corredor reto e tranqüilo
que nós percorrermos livres e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens,
pelas quais nós devemos procurar nosso caminho,
perdidos e confusos,
de vez em quando presos em um beco sem saída.
Porém, se tivermos fé,
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual nós pensamos,
mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A. J. Cronin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	01
LISTA DE TABELAS	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1- INTRODUÇÃO	17
2- REVISÃO DA LITERATURA	19
3- JUSTIFICATIVA	29
4- OBJETIVOS	31
5- MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
6- RESULTADOS	43
7- DISCUSSÃO	93
8- CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS.....	111
COMITÊ DE ÉTICA	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	GVHDc com aspecto liquenóide em assoalho de boca	24
Figura 02	Número de pacientes de acordo com o gênero masculino e feminino	44
Figura 03	Gênero do doador no grupo-controle e no grupo-experimental	45
Figura 04	Distribuição dos pacientes do grupo-controle e grupo-experimental de acordo com a década de vida	46
Figura 05	Número de pacientes quanto ao tipo de transplante realizado no grupo-controle e no grupo-experimental	48
Figura 06	Número de pacientes em relação à compatibilidade do sistema ABO no grupo-controle e no grupo-experimental	49
Figura 07	Número de pacientes quanto à doença de base	50
Figura 08	Número de pacientes quanto à presença e ausência de GVHDA no grupo-controle e no grupo-experimental	52
Figura 09	Relação entre o número de pacientes com GVHDA do grupo-controle e grupo-experimental e envolvimento de outros órgãos	53
Figura 10	Porcentagem de pacientes em relação ao tipo de infecção pós-TMO no grupo-experimental	54
Figura 11	Porcentagem de pacientes que apresentaram infecção pós-TMO no grupo-controle	55

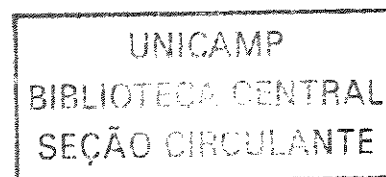


Figura 12	Porcentagem de pacientes que apresentaram GVHDc extensa e localizada no grupo-experimental	57
Figura 13	Porcentagem de pacientes do grupo-experimental acometidos por GVHDc e envolvimento de órgãos	58
Figura 14	Situação clínica atual dos pacientes do grupo-controle e grupo-experimental.	59
Figura 15	Curva de sobrevida dos pacientes do grupo-experimental e do grupo-controle	60
Figura 16	Intensidade de vacuolização da camada basal no grupo-controle e grupo-experimental	65
Figura 17	Intensidade do infiltrado inflamatório no grupo-controle e grupo-experimental.	65
Figura 18	Grau de exocitose na mucosa no grupo-controle e grupo-experimental.	66
Figura 19	Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos da GVHDc grau II, mostrando infiltrado inflamatório, exocitose e corpos apoptóticos com presença de linfócitos (H&E – 400X).	66
Figura 20	Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos de GVHDc grau III, mostrando infiltrado inflamatório intenso, exocitose e um início de clivagem focal entre o epitélio e o conjuntivo (H&E – 400X).	67

Figura 21	Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos de GVHDc grau IV, mostrando tecido subepitelial com intenso infiltrado inflamatório e clivagem total entre o epitélio e o conjuntivo (H&E – 400X)	67
Figura 22	Classificação histológica da GVHDc no grupo-experimental	68
Figura 23	Infiltrado inflamatório nas glândulas salivares no grupo-controle e grupo-experimental	73
Figura 24	Grau de diminuição do número de ductos e ácinos no grupo-controle e grupo-experimental	73
Figura 25	Grau de dilatação ductal no grupo-controle e grupo-experimental	74
Figura 26	Grau de fibrose no grupo-controle e grupo-experimental	74
Figura 27	Grau histológico de GVHDc em glândulas salivares no grupo-controle e grupo-experimental	75
Figura 28	Corte histológico de glândulas salivares menores com alterações morfológicas de GVHDc grau II, mostrando infiltrado inflamatório intersticial leve (H&E – 200X)	76
Figura 29	Corte histológico de glândulas salivares menores com alterações morfológicas de GVHDc grau III, mostrando intenso infiltrado inflamatório com destruição acinar moderada (H&E – 200X)	76

Figura 30	Corte histológico de glândulas salivares com alterações morfológicas de GVHDc grau IV, mostrando perda acentuada de ácinos, dilatação ductal e intensa fibrose (H&E – 200X)	77
Figura 31	Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células imuno-marcadas no tecido epitelial	82
Figura 32	Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células positivas no tecido conjuntivo	83
Figura 33	Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células imuno-marcadas nas glândulas salivares	84
Figura 34	Colunas dos valores médios de contagem das células positivas no tecido epitelial, conjuntivo e nas glândulas salivares no grupo-experimental	85
Figura 35	Valores das médias da contagem CD4 e CD8 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental	86
Figura 36	Valores das médias da contagem CD45 e CD20 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental	87
Figura 37	Valores das médias das contagens de CD4 e CD8 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental	88
Figura 38	Marcação imunoistoquímica para CD68, onde observamos a positividade de macrófagos na mucosa oral (200X)	90

Figura 39	Marcação imunoistoquímica para CD68, onde observamos a positividade de macrófagos nas glândulas salivares menores (200X)	90
Figura 40	Marcação imunoistoquímica para CD45, onde observamos a positividade de linfócitos na mucosa oral (400X)	91
Figura 41	Marcação imunoistoquímica para CD45, onde observamos a positividade de linfócitos nas glândulas salivares menores	91
Figura 42	Marcação imunoistoquímica para CD8, onde observamos a positividade de linfócitos citotóxicos na mucosa oral (200X)	92
Figura 43	Marcação imunoistoquímica para CD8, onde observamos a positividade de linfócitos citotóxicos nas glândulas salivares menores (400X)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Classificação da GVHDc segundo Shulman <i>et al.</i> , 1980 – Seattle	22
Tabela 02	Classificação histopatológica para o diagnóstico de GVHDc em mucosa oral e glândulas salivares menores segundo Horn <i>et al</i> , 1995	26
Tabela 03	Dados clínicos dos pacientes com GVHDc	38
Tabela 04	Dados clínicos dos pacientes com GVHDc	39
Tabela 05	Dados clínicos dos pacientes com GVHDc	40
Tabela 06	Dados clínicos dos pacientes do grupo controle	41
Tabela 07	Dados clínicos dos pacientes do grupo controle	42
Tabela 08	Distribuição do gênero dos pacientes nos grupos controle e experimental	44
Tabela 09	Distribuição gênero do doado no grupo-controle e no grupo- experimental	45
Tabela 10	Distribuição dos pacientes quanto à idade nos grupos controle e experimental	46
Tabela 11	Distribuição dos pacientes no grupo-controle e grupo- experimental quanto ao tipo de transplante realizado	48
Tabela 12	Compatibilidade do Sistema ABO nos grupos controle e experimental	49

Tabela 13	Número de pacientes em relação à doença de base no grupo-controle e no grupo-experimental	50
Tabela 14	Número de pacientes quanto à frequência de GVHDa no grupo-controle e grupo-experimental	52
Tabela 15	Relação entre o número de pacientes no grupo-controle e no grupo-experimental quanto ao envolvimento de outros órgãos	53
Tabela 16	Número de pacientes em relação ao tipo de infecção pós-TMO no grupo-experimental	54
Tabela 17	Número de pacientes em relação ao tipo de infecções pós-TMO do grupo-controle	55
Tabela 18	Classificação clínica da extensão da GVHDc	57
Tabela 19	Relação entre o número de pacientes, do grupo-experimental, acometidos por GVHDc e o envolvimento de órgãos	58
Tabela 20	Número de pacientes vivos e mortos no grupo-controle e grupo-experimental	59
Tabela 21	Características histopatológicas do grupo-experimental- mucosa bucal	63
Tabela 22	Características histológicas do grupo-controle- mucosa oral	64
Tabela 23	Classificação histológica do grupo-experimental	68
Tabela 24	Características histopatológicas de GVHDc em glândulas salivares menores no grupo-experimental	71

Tabela 25	Características histopatológicas de GVHDc em glândulas salivares menores no grupo-controle	72
Tabela 26	Classificação Histológica da GVHDc em glândulas salivares nos grupos controle e experimental	75
Tabela 27	Expressão dos marcadores imunoistoquímicos na mucosa oral	79
Tabela 28	Expressão dos marcadores imunoistoquímicos em glândulas salivares	80
Tabela 29	Valores das medias das contagens nos grupos controle e experimental para os marcadores CD68, CD45, CD4, CD8 e CD20, no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AA:	Anemia Aplásica
ABD:	Anemia de Blackfound Diamond
Cond:	Condicionamento
CMV:	Citomegalovírus
CTP	Células-tronco-periféricas
F:	Feminino
GVHD:	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH)
GVHDA:	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro aguda
GVHDc:	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro crônica
HLA:	Antígenos Leucocitários Humano
HPV:	Papiloma Vírus Humano
HPN:	Hemoglobinúria paroxística noturna
HSV:	Herpes Simples Vírus
LLA:	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC:	Leucemia Linfoblástica Crônica
LMC:	Leucemia Mielóide Crônica
LMA:	Leucemia Mielóide Aguda
M:	Masculino
MM:	Mieloma Múltiplo
MO:	Medula óssea
Septc:	Septicemia
SMD:	Síndrome Mielo-Displásica

SS: Síndrome de Sjögren

TGI: Trato-gastro-intestinal

TMO: Transplante de Medula Óssea

VZV: Vírus Varicela Zoster

RESUMO

A Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Crônica – DECH (Graft-versus-host disease cronic- GVHDc) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. As alterações clínicas e histopatológicas na cavidade oral podem preceder as manifestações da GVHDc em outros órgãos. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis fatores associados ao desenvolvimento da doença e as diferenças histopatológicas e imunoistoquímicas entre as alterações de condicionamento e GVHDc, bem como determinar o perfil imunofenotípico predominante das células inflamatórias na GVHDc presentes na mucosa oral e glândulas salivares menores. Foram selecionadas 25 amostras de mucosa labial de pacientes que desenvolveram GVHDc (grupo-experimental) e 16 de pacientes que não desenvolveram GVHDc (grupo controle) nos arquivos do Departamento de Anatomia-Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. As informações clínicas referentes à idade, gênero do receptor, doença de base, tipo de transplante, sexo do doador, compatibilidade do sistema HLA e ABO, presença de infecções virais, desenvolvimento de GVHDA, órgãos afetados na GVHDc, foram obtidas dos prontuários médicos. Foram realizados cortes histológicos do material parafinado, os quais foram corados para HE. Posteriormente, realizou-se estudo imunoistoquímico do infiltrado inflamatório com os seguintes anticorpos: CD68, CD45, CD 4, CD8 e CD20. Idade avançada dos pacientes, transplante de células-tronco-periféricas e presença de infecções virais demonstraram ser fatores de

risco para GVHDc. Vacuolização da camada basal, infiltrado linfóide, exocitose, células acidófilas contraídas, clivagem focal ou separação entre o epitélio e o conjuntivo são as alterações histológicas que mais diferenciam GVHDc de alterações do condicionamento na mucosa oral. As alterações histopatológicas mais comuns em glândulas salivares menores foram: infiltrado inflamatório linfocitário moderado, fibrose intersticial e diminuição do número de ductos e ácinos. As células predominantes na GVHDc foram linfócitos T citotóxicos, tanto no tecido epitelial, como no tecido conjuntivo e glândulas salivares. Esses resultados indicam que as principais células envolvidas na etiopatogenia da GVHDc na mucosa oral e glândulas salivares menores são os linfócitos T citotóxicos, mas macrófagos e linfócitos auxiliares também participam da patogenia da doença.

ABSTRACT

The major cause of morbidity and mortality in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation is graft-versus-host disease (GVHD). The clinical and histological manifestation of oral mucosa can precede other organ involvement in the GVHDc.

The aim of our study was to evaluate the predictive risk factors to GVHDc, the histological and immunohistochemical differences between patients with or without GVHDc, as well as to evaluate the immunophenotype of the inflammatory cells in oral mucosa and labial salivary gland. Twenty-five patients who had GVHDc (experimental-group) and 16 patients who had not GVHDc were selected. The data patient, gender, underlying disease, type of transplantation, donor gender, compatibility of the system ABO and HLA, infection diseases, previous GVHDa, organ involved in the GVHDc, were obtained from the clinical records. The slides were firstly examined in H&E. Immunohistochemical analyses included the following antibodies CD68, CD45, CD4, CD8, CD20. The age of the patients (oldest), type of transplantation and infection disease were found risk factors to GVHDc. Hydropic degeneration of the basal cells, apoptotic bodies, lymphocytic infiltration, and focal or total clivage between epithelial and connective tissue were histological features that could be used to differentiate GVHDc from chemotherapy effects on oral mucosa. In the labial salivary glands the lymphocytic infiltration, acinar loss and fibrosis were the main alteration. The predominant cells in GVHDc were CD8 T cells in epithelium, connective tissue as much as in salivary glands.

1 - INTRODUÇÃO

O transplante de medula óssea (TMO) tem sido utilizado como tratamento em diversas doenças onco-hematológicas, tais como leucemias, linfomas, tumores de mama e anemia aplásica (Woo *et al.*, 1997). A doença do enxerto contra o hospedeiro – DECH (Graft-versus-host-disease GVHD) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes que foram submetidos a transplante de medula óssea alogênico (Galitis *et al.*, 2001).

A GVHDc ocorre devido à presença de células imunocompetentes na medula do doador que provavelmente reconhecem antígenos de histocompatibilidade menor do hospedeiro provocando uma resposta imune destrutiva (Eisner *et al.*, 1995).

Duas formas de GVHD têm sido descritas: aguda (GVHDa) e crônica (GVHDc), dependendo da época de aparecimento das manifestações clínicas. Na forma aguda as manifestações aparecem antes dos 100 dias pós-transplante e é caracterizada pelo envolvimento da pele, fígado e trato gastrointestinal (Hasséus *et al.* 2001). A forma crônica apresenta características de autoimunidade e imunodeficiência, e é definida por ocorrer após 100 dias do transplante. As manifestações clínicas podem envolver vários sistemas, sendo as mais comuns lesões esclerodermóides, doença hepática crônica, síndrome de Sjögren-like, xerostomia e mudanças na mucosa oral e gastrointestinal (Nakamura *et al.*, 1996).

Na cavidade oral as alterações mais freqüentes são: eritema, atrofia da mucosa, lesões liquenóides, disfagia, perda do paladar e alteração do fluxo salivar (Woo *et al.*, 1997). Essas lesões podem preceder o envolvimento da doença em outros órgãos, sendo por isso usadas como um método de diagnóstico precoce da doença, auxiliando tanto na evolução como no prognóstico (Nakamura *et al.*, 1996).

As alterações histológicas observadas na mucosa oral são: atrofia do epitélio com degeneração hidrópica das células da camada basal, presença de corpos apoptóticos e infiltrado linfocítico que também pode estar associado ao uso de drogas imunossupressoras (Hiroki *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1997). Nas glândulas salivares menores as alterações histopatológicas podem apresentar inicialmente um infiltrado linfoplasmocitário ou linfocítico ao redor de ductos excretórios e região intralobular, seguido por destruição e fibrose intersticial, podendo ocorrer perda glandular (Hiroki *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1997).

Os estudos com anticorpos monoclonais estão permitindo a identificação das populações celulares envolvidas na GVHDc oral, no entanto, os resultados não são conclusivos. Alguns autores relatam a predominância de células T, CD4 (Hasséus *et al.*, 2001; Mattsson *et al.*, 1992), enquanto que outros autores acreditam haver um predomínio de células T, CD8 (Nakamura *et al.*, 1996).

2- REVISÃO DA LITERATURA

O TMO tem sido utilizado como tratamento em diversas doenças onco-hematológicas, tais como leucemias, linfomas, tumores de mama e anemia aplásica (Woo *et al.*, 1997). A GVHD é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes que foram submetidos a transplante de medula óssea alogênico (Galitis *et al.*, 2001).

Em 1967 vanBekkum & deVries observaram que camundongos transplantados com medula geneticamente não idêntica, desenvolviam uma doença caracterizada por alterações epiteliais associadas a diarreia e a alterações hepáticas. Esta doença recebeu o nome de doença do enxerto contra o hospedeiro. A GVHD é conhecida como uma síndrome de autoimunidade e imunodeficiência, onde linfócitos da medula transplantada, reconhecem como estranhos os antígenos do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro, proliferando e atacando os tecidos do receptor (Woo *et al.*, 1997).

De acordo com a descrição clássica de Billingham (1966) a GVHD necessita de três eventos para a sua iniciação: 1) Presença de células imunocompetentes do doador, capazes de reconhecer como estranhos os antígenos de histocompatibilidade do hospedeiro, 2) Diferenças geneticamente determinadas de histocompatibilidade entre o doador e o receptor, 3) O hospedeiro ser incapaz de reagir contra o processo desencadeado. No entanto, a GVHD também pode ser observada em transplantes singênicos e autólogos (Rappeport *et al.*, 1979; Thein *et al.*, 1981), o que não é possível de ser explicado

pelo postulado de Bilingham. Portanto, foi necessário acrescentar a este postulado a hipótese do reconhecimento inapropriado dos antígenos do próprio hospedeiro, caracterizando assim, um processo auto-imune relacionado à síndrome do enxerto contra o hospedeiro (Martin, 1994; Vogelsang *et al.*, 1988).

Duas formas de GVHD têm sido descritas: aguda (GVHDa) e crônica (GVHDc), dependendo da época de aparecimento das manifestações clínicas. Na forma aguda as manifestações aparecem antes dos 100 dias pós-transplante e é caracterizada pelo envolvimento da pele, fígado e trato gastrointestinal (Hasséus *et al.* 2001). A forma crônica ocorre após 100 dias do transplante, sendo reconhecida somente a partir da década de 70, quando os pacientes submetidos ao TMO, sobreviveram tempo suficiente para a sua manifestação (Storb *et al.*, 1976).

A GVHDc pode ocorrer de 3 a 15 meses após o TMO (Galitis *et al.*, 2001), podendo se manifestar como continuação da forma aguda (GVHDc progressiva), após a resolução da forma aguda (quiescente), ou surgir como primeira manifestação da GVHD, não havendo precedência da forma aguda (Atkison, 1990).

A GVHDc afeta em torno de 50% dos adultos e 20% das crianças transplantadas (Galitis *et al.*, 2001). No entanto, esta incidência pode variar bastante, dependendo do regime de condicionamento, profilaxia para GVHDc e do grau de compatibilidade do sistema HLA entre o doador e receptor (Mattsson *et al.*, 1992).

A literatura relata como fatores de risco para a GVHDc a disparidade entre HLA, desenvolvimento prévio de GVHD aguda, idade avançada do receptor e do doador, doador do gênero feminino para receptores do gênero masculino, transplante realizado através de punção de células tronco-periféricas, uso de radiação corpórea total como regime de condicionamento, e, leucemia mielóide crônica em comparação com as demais doenças de base (Atkinson *et al.*, 1990; Carlens *et al.*, 1998; Zecca *et al.*, 2002).

A GVHDc ocorre mais freqüentemente e com maior gravidade em ambientes microbianos. Além de influências bacterianas, infecções virais, principalmente pela família do herpes vírus, como citomegalovirus (CMV) e vírus herpes simples (HSV), parecem ter um papel no início ou agravamento da GVHD (Curtis & Caughman, 1994). Em vários estudos clínicos observou-se que, quando o doador ou o receptor de TMO eram soropositivos para diversas herpesviroses, havia aumento da incidência de GVHD crônica e aguda (Curtis & Caughman, 1994; Boström *et al.*, 1988).

As manifestações clínicas da GVHDc são bastante variadas, podendo ocorrer disfunção hepática, fibrose pulmonar, pele com lesões liquenóides ou escleróticas, alterações na mucosa gastrointestinal e mucosa oral, e redução no fluxo salivar (Nakamura *et al.*, 1996). De acordo com o grau de envolvimento clínico e histopatológico, a GVHDc foi classificada em 1980 por Shulman *et al.* em limitada e extensa, conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da GVHDc segundo Shulman *et al.*, 1980 – Seattle

Classificação da GVHDc segundo o grau de envolvimento clínico	
GVHDc Limitada	Isolada ou Associada - pele - disfunção hepática devido a GVHD
GVHDc Extensa	Isolada - envolvimento generalizado da pele - envolvimento localizado da pele e/ou disfunção hepática devido a GVHDc Associada - histopatologia hepática demonstrando hepatite crônica agressiva, cirrose e, - envolvimento ocular e/ou - envolvimento de glândulas salivares e/ou mucosa bucal ou - envolvimento de outros órgãos

Shulman *et al.*, 1980

Na cavidade oral as alterações mais frequentes são: eritema, atrofia da mucosa, lesões liquenóides, disfagia, perda do paladar e alteração do fluxo salivar (Redding *et al.*, 1998; Correa, 1999; Villar, 2001) (figura 1). Dentre estas manifestações, a lesão liquenóide é a mais comum, sendo observada em 80 a 100% dos pacientes com GVHDc oral. (Galitis *et al.*, 2001).

Clinicamente, as lesões liquenóides são caracterizadas por pápulas filiformes radiadas, brancas ou acinzentadas, aveludadas, dispostas de modo linear, reticular ou anelar, formando áreas circunscritas, anéis e estrias na mucosa. A forma erosiva, semelhante à do líquen plano erosivo, também pode se manifestar na GVHDc. Justapostas às áreas de atrofia, podem ser encontradas

úlceras, que aparecem como áreas cruentas, doloridas, de tamanhos e formas variadas (Correa, 1999; Villar 2001).

Cândida, Vírus Herpes Simples (HSV), Citomegalovírus (CMV) e outros agentes infecciosos oportunistas podem freqüentemente estar associados a GVHDc oral (Le Veque *et al.*, 1994), devido ao dano tecidual local e a terapia de imunossupressão realizada nestes pacientes (Woo *et al.*, 1997).

Xerostomia tem sido relatada em aproximadamente 50% dos pacientes com GVHDc (Schubert *et al.*, 1984; Hiroki *et al.*, 1994). Entretanto, o condicionamento através de irradiação corpórea total realizada nos pacientes submetidos ao TMO (Jones *et al.*, 1992; Chaushu *et al.*, 1995), causa uma redução no fluxo salivar. Alguns trabalhos têm demonstrado não haver diferença na redução do fluxo salivar entre pacientes com e sem GVHDc, sugerindo que a xerostomia seja apenas um efeito da quimiotoxicidade e não uma alteração causada pela GVHDc (Dens *et al.*, 1996). Foram relatados casos de cáries rampantes em pacientes com GVHDc (Heimdaahl *et al.*, 1985; Curtis & Caughman, 1994). Contudo a associação entre cárie rampante e redução do fluxo salivar não é bem compreendida, pois a maioria dos pacientes com acentuada redução do fluxo salivar não apresentou cárie (Heimdaahl *et al.*, 1985).

Schubert & Sullivan, (1980) relataram a formação de mucocelos superficiais como resultado do envolvimento da GVHDc em ductos das glândulas salivares menores. Anosmia, ageusia e granuloma piogênico também podem raramente aparecer na GVHDc. (Le Veque, 1990; Lee *et al.*, 1994).



Figura 1 – GVHDc com aspecto liquenóide em assoalho de boca

As manifestações orais da GVHDc podem clinicamente se assemelhar a diversas doenças auto-imune, tais como líquen plano reticular e ulcerativo, esclerose sistêmica, lúpus eritematoso e Síndrome de Sjögren. Além destas, as alterações bucais também podem ser confundidas com infecções fúngicas, virais e efeitos da quimiotoxicidade (Schubert *et al.*, 1984).

Atualmente, a realização de exame clínico oral e biópsia de lábio tem sido utilizadas para o diagnóstico precoce de GVHDc (Galitis *et al.*, 2001), pois as alterações orais podem preceder as manifestações de GVHDc em diversos outros órgãos, como fígado e pulmão (Nakamura *et al.*, 1996).

As alterações histológicas observadas na mucosa oral são: atrofia do epitélio com degeneração hidrópica das células da camada basal, presença de

corpos apoptóticos, mucosite na interface entre o epitélio e o conjuntivo, e infiltrado linfocítico que também pode estar vinculado ao uso de drogas imunossupressoras (Hiroki *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1997). Estas alterações histopatológicas são semelhantes às encontradas no líquen plano (LP). Villar (2001) realizou um estudo histopatológico e imunoistoquímico para diferenciar estas duas lesões. Foi observado que o LP em boca pode ser diferenciado microscopicamente da reação líquenóide da GVHDc, pois no LP o infiltrado é mais denso e em banda, enquanto que na GVHDc é difuso. As alterações epiteliais, principalmente na camada basal, são mais intensa e evidentes na GVHDc do que no LP, as células de Langerhans e os mastócitos estão presentes em maior números no LP, enquanto os macrófagos são mais numerosos na GVHDc.

Histopatologicamente, as glândulas salivares menores podem apresentar inicialmente um infiltrado linfoplasmocitário ou linfocítico ao redor de ductos excretores e região intralobular, seguido por destruição e fibrose intersticial, podendo ocorrer perda glandular (Hiroki *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1997). Alguns autores observaram que quando as glândulas salivares e a mucosa oral de revestimento apresentam alterações compatíveis com GVHDc, há uma correlação de 100% com o envolvimento sistêmico da doença (Nakhleh *et al.*, 1989).

Horn *et al.*, em 1995, publicaram uma proposta para classificação da GVHDc oral, conforme ilustrado na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação histopatológica para o diagnóstico de GVHDc em mucosa oral e glândulas salivares menores segundo Horn *et al*, 1995.

Grau	Características Histológicas
1	Mucosa: vacuolização da camada de células basais, moderado infiltrado linfocitário, moderada exocitose epitelial. Glândula Salivar: moderado infiltrado intersticial.
2	Mucosa : vacuolização da camada de células basais, células epiteliais disceratóticas, necrose de ceratinócitos com satelitose, moderado a intenso infiltrado linfocitário na submucosa e moderada exocitose epitelial. Glândula Salivar: moderada destruição acinar, dilatação ductal, metaplasia escamosa, acúmulo de muco, fibrose moderada, proliferação de células ductais e infiltrado linfocitário periductal
3	Mucosa: clivagem focal entre o epitélio e o conjuntivo, intenso infiltrado linfocitário no conjuntivo, células epiteliais disceratóticas, exocitose linfocitária. Glândula Salivar: intenso infiltrado linfocitário intersticial, destruição difusa de ductos e ácinos.
4	Mucosa: separação total entre o epitélio e o conjuntivo. Glândula Salivar: completa perda dos ácinos, ductos intensamente dilatados e fibrose intersticial com ou sem infiltrado inflamatório.

Horn *et al*, 1995

A nomenclatura Síndrome de Sjögren-like tem sido utilizada para os casos de GVHDc associados com secura ocular e xerostomia. Entretanto, o envolvimento glandular na GVHDc apresenta características histológicas bem diferentes da Síndrome de Sjögren (SS). Um infiltrado focal periductal linfocítico é bem característico na SS, enquanto que na GVHDc o infiltrado é mais difuso. O

infiltrado linfocítico na SS é predominantemente de linfócitos T, CD4, mas alguns linfócitos B podem ser encontrados, a GVHDc apresenta apenas linfócitos T, com um predomínio de CD8 (Nakamura *et al.*, 1996).

Atualmente, estudos com anticorpos monoclonais permitiram a identificação das populações celulares envolvidas na GVHDc oral, principalmente nas lesões liquenóides. No entanto, os resultados não são conclusivos. Alguns autores relatam a predominância de células T, CD4 (Hasséus *et al.*, 2001; Mattsson *et al.*, 1992), enquanto que outros autores acreditam haver um predomínio de células T, CD8 (Nakamura *et al.*, 1996).

O tratamento de GVHDc é realizado através da administração de imunossupressores, tais como prednisona, azatioprina, ciclosporina e ciclofosfamida, podendo ser usados isolados ou em combinações (Atkinson, 1990). Psoralen, juntamente com raio ultravioleta A (PUVA), tem sido utilizado em diversos centros de transplante como uma opção de tratamento de GVHDc de pele e boca nos pacientes que desenvolveram resistência às medicações imunossupresoras (Redding *et al.*, 1998). A Talidomida tem sido empregada no tratamento de GVHDc muco-cutânea, com excelentes resultados (Rovelli *et al.*, 1998). Bioadesivo bucal com ciclosporina também tem sido usado para as lesões liquenóides orais, em associação ao tratamento imunossupressor sistêmico (Epstein *et al.*, 1996).

3 - JUSTIFICATIVA

A GVHDc é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados de medula óssea. As alterações clínicas e histopatológicas na cavidade oral podem preceder as manifestações em outros órgãos, podendo, representar um método de diagnóstico precoce da doença. Desta forma, os achados morfológicos que permitem o diagnóstico preciso da doença, discriminando-a de outros processos, precisam ser bem conhecidos. Os resultados deste trabalho poderão nos fornecer dados para um melhor conhecimento da doença, contribuindo para a melhoria do prognóstico, qualidade de vida e sobrevida do paciente.

4 – OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1 – Descrever as características clínicas dos pacientes tratados com o transplante de medula óssea, verificando os possíveis fatores associados ao desenvolvimento de GVHDc na cavidade oral,
- 2 – Comparar as alterações histopatológicas entre os pacientes tratados com TMO, com e sem GVHDc
- 3 – Estudar a expressão imunoistoquímica dos marcadores CD 68, CD 45, CD 4, CD 8 e CD 20 no infiltrado linfocítico observado na mucosa oral e glândulas salivares menores.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Casuística

No período de Setembro de 1993 a Setembro de 2002, foram avaliados 255 prontuários de pacientes tratados com o TMO para doenças onco-hematológicas. Em obediência aos critérios de inclusão e exclusão abaixo listados, foram estudados 25 pacientes com GVHDc oral e 16 pacientes sem GVHDc (grupo controle).

Todos os pacientes foram incluídos nos regimes de condicionamento e profilaxia de GVHDc conforme o protocolo do serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

Todos os pacientes foram tratados da GVHDc conforme o protocolo do Transplante de Medula Óssea (TMO) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

5.2 - Critérios de Inclusão

- ω Pacientes que foram tratados com transplante de medula óssea alogênica, aparentado e HLA idêntico.
- ω Pacientes que receberam enxertos coletados por aspiração da medula óssea (MO) ou que receberam enxerto de células tronco-periféricas (CTP).

5.3 - Critérios de Exclusão

- ω Pacientes que foram a óbito até três meses após o transplante,
- ω Pacientes em que não foi coletada a glândula salivar menor por ocasião do procedimento de biópsia para o diagnóstico de GVHDc,
- ω Pacientes com biópsias cujos os blocos não havia quantidade suficiente de material para realização de novos cortes histológicos para exames imunoistoquímicos.

5.4 - Avaliação Histopatológico

Foram realizados cortes de 5µm de espessura dos tecidos emblocados em parafina para a confecção de lâminas coradas em H&E (hematoxilina e eosina). Foram escolhidas somente as amostras que permitiram definir o diagnóstico da doença. Essas lâminas foram revistas por dois examinadores (ABS e MLC) para a confirmação do diagnóstico e classificação quanto ao grau histológico (I, II, III e IV), segundo os critérios de Horn (Anexo A). Quando diferentes graus de acometimento ocorriam em um mesmo espécime, era escolhido o grau que predominava nos espécimes.

5.5 – Avaliação Imunoistoquímica

Foram realizados cortes de 3µm de espessura dos tecidos incluídos em parafina. Os cortes foram desparafinados em duas trocas de xilol, 30 minutos em estufa (xilol I) e 20 minutos em temperatura ambiente (xilol II). A seguir os cortes foram hidratados em soluções decrescentes de álcool (absoluto, 90%, 70% e

50%) e lavados em água corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) em cinco trocas de cinco minutos. Os cortes foram então lavados em água corrente.

O procedimento de recuperação antigênica foi realizado colocando os cortes em um recipiente com solução de ácido cítrico (pH 6,0), que foram levados ao microondas em potência alta por dois ciclos de 12 minutos. Após duas horas, tempo necessário para que ocorra o resfriamento do líquido, os cortes foram lavados com solução fosfatada tamponada (PBS: phosphate-buffered saline) e incubados "overnight" (durante a noite) com os seguintes anticorpos primários: CD68 (Clone P6-M1) , CD20 (Clone L26), CD45 (Clone UHCL1), CD8 (Clone C8/144) e CD45RO (Clone OPD 4).

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram incubados com o complexo Streptoavidina – Biotina por mais 30 minutos. A revelação da reação foi realizada usando diaminobenzidina (DAB) por cinco minutos e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

O grupo de cortes de glândulas salivares de pacientes que não desenvolveram GVHDc, também foi submetido às reações imunoistoquímicas, com o objetivo de servir como controle de expressão dos marcadores.

O padrão de marcação imunoistoquímica foi analisado à microscopia ótica e anotado individualmente (Anexo A). A análise quantitativa das células imunocompetentes (CD 68, Pan B, Pan T, CD4 e CD 8) foi realizada em sistema de análise de imagem Zeiss (Kontron 400), em um aumento de 400x. O número de células positivas na glândula salivar foi calculado pela média aritmética da contagem de 10 campos, ao acaso, do lóbulo mais afetado, de cada amostra. Na mucosa oral, o epitélio e conjuntivo foram analisados separadamente. Em cada fragmento foram escolhidas, ao acaso, cinco áreas, para contagem das células positivas.

5.6 – Avaliação Clínica

Foram analisados os prontuários de todos os pacientes e coletadas informações referentes à idade, sexo, doença de base, dia do TMO, tipo do transplante alogênico, sexo do doador, compatibilidade do sistema HLA e ABO, presença ou não de infecção pós-transplante, presença ou não de GVHDa e órgão(s) acometido(s), resultados das biópsias do d+100 (pele e cavidade oral), dia do diagnóstico de GVHDc, extensão da GVHDc e órgão(s) acometidos e tempo de sobrevida até o dia em que a análise foi concluída (Setembro de 2002). Nos pacientes que evoluíram para o óbito, ainda foram avaliados a causa de óbito e o tempo de sobrevida pós TMO. Todas estas informações foram sumariadas nas tabelas 3, 4 e 5 (pacientes que desenvolveram GVHDc) e nas tabelas 6 e 7 (pacientes do grupo controle).

5.7 – Análise Estatística

5.7.1 - Comparação de Proporções

Para a comparação de proporções entre as diversas variáveis estudadas foi realizado o teste do qui-quadrado. Quando necessário, devido frequências esperadas menores do que cinco ou ao pequeno número de amostra realizada, o teste do qui-quadrado foi substituído pelo teste exato de Fisher.

5.7.2 – Comparação de Médias

Para a comparação de médias foi realizado o teste t de Student para amostras independentes ou teste de Student para dados pareados, conforme a situação.

5.7.3 – Associação entre Variáveis

As associações entre as diversas variáveis, foram estudadas através da análise de correlação simples de Pearson.

5.7.4 – Análise de Sobrevida

A sobrevida global, a qual corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento (transplante) e o óbito do paciente, ou, o tempo entre início do tratamento e a última informação obtida, foi realizada através do método de Kaplan-Meier complementado pelo teste de log-rank.

Para todos os testes foi adotado o nível de 5% ($p < 0,05$) de significância.

Tabela 3 - Dados clínicos dos pacientes com GVHDc

UPN	Gênero	Idade	Doença	Tipo de TMO	Doador	ABO
20	M	41	SMD	CTP	Irmão (M)	Incompatível
69	M	38	LMA	MO	Irmão (M)	Compatível
86	M	35	LMC	MO	Irmão (M)	Compatível
100	M	20	AA	MO	Irmã (F)	Incompatível
113	M	46	MM	MO	Irmã (F)	Compatível
125	F	29	LMC	CTP	Irmã (F)	Incompatível
128	F	42	LMC	CTP	Irmão (M)	Incompatível
132	M	26	HPN	CTP	Irmão (M)	Compatível
136	M	44	LMC	MO	Irmão (M)	Incompatível
148	F	38	LMC	MO	Irmã (F)	Incompatível
152	F	43	LMC	CTP	Irmão (M)	Compatível
153	F	43	LMC	MO	Irmão (M)	Compatível
177	F	25	LMC	CTP	Irmão (M)	Compatível
180	M	24	LMC	MO	Irmã (F)	Compatível
203	M	54	LMC	CTP	Irmão (M)	Incompatível
209	M	41	LMC	CTP	Irmão (M)	Compatível
217	F	24	LMC	MO	Irmã (F)	Incompatível
248	F	30	LMC	CTP	Irmão (M)	Incompatível
253	M	20	LMA	MO	Irmã (F)	Incompatível
258	M	44	LMC	MO	Irmã (F)	Compatível
259	F	14	LLA	CTP	Irmã (F)	Incompatível
260	M	41	LMC	MO	Irmã (F)	Incompatível
261	M	43	LMC	MO	Irmão (M)	Compatível
262	M	35	LMA	MO	Irmã (F)	Compatível
263	M	42	LMA	CTP	Irmã (F)	Incompatível

M: masculino; F: feminino; SMD: Síndrome Miélo-Displásica; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LMC: Leucemia Mielóide Crônica; AA: Anemia Aplásica; MM: Mieloma Múltiplo; HPN: Hemoglobinúria paroxística noturna; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; CTP: células tronco periféricas; MO: medula óssea.

Tabela 4 - Dados clínicos dos pacientes com GVHDc

UPN	Infecções	GVHDa	Órgão	d+100 pele	d+100 boca
20	CMV	Não	-----	Cond	Cond
69	HSV 1	Não	-----	Cond	GVHD
86	HSV 2/ HPV	Não	-----	Cond	Cond
100	HSV 2/ CMV/ HSV	Localizada	Pele	Cond	Cond
113	HSV 2	Não	-----	Cond	GVHD
125	HSV 2/ CMV	Não	-----	Cond	Cond
128	HSV 2	Não	-----	GVHD	GVHD
132	CMV	Localizada	TGI	Cond	Cond
136	CMV	Não	-----	Cond	GVHD
148	VZV	Não	-----	Cond	Cond
152	HSV	Não	-----	Cond	Cond
153	HSV 2/ VZV/ CMV	Extensa	Pele/ TGI	Cond	Cond
177	VZV/ CMV	Não	-----	Cond	GVHD
180	Não	Não	-----	Cond	Cond
203	VZV/ CMV	Não	-----	Cond	Cond
209	Não	Não	-----	Cond	Cond
217	CMV	Não	-----	Cond	Cond
248	VZV	Não	-----	GVHD	Cond
253	CMV	Não	-----	Cond	Cond
258	HSV 2	Não	-----	Cond	Cond
259	CMV	Não	-----	Cond	Cond
260	CMV	Não	-----	GVHD	Cond
261	CMV	Não	-----	Cond	Cond
262	VZV	Não	-----	Cond	Cond
263	CMV	Não	-----	Cond	Cond

CMV: Citomegalo Vírus; HSV: Herpes Vírus Humano; HPV: Papiloma Vírus Humano; VZV: Varicela Zoster Vírus; TGI: trato-gastro-intestinal; Cond: condicionamento.

Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes com GVHDc

UPN	GVHDc	Dia Dg	Órgão	Atual	Óbito	Causa	S Vida
20	Extensa	d+ 281	Boca/ pele/ olho	d+ 2818			
69	Extensa	d+ 100	Boca/ fígado	d+ 664			
86	Extensa	d+ 547	Boca/ fígado/ pele/ olho	d+ 2174			
100	Extensa	d+ 226	Boca/ pele/ fígado	d+ 1849			
113	Localizada	d+ 167	Boca	-----	X	Septc	229
125	Extensa	d+ 230	Boca/ fígado	d+ 1607			
128	Extensa	d+ 124	Boca/ pele/ olho/ fígado	-----	X	GVHD	129
132	Extensa	d+ 263	Boca/ fígado/ olho	d+ 1553			
136	Extensa	d+ 100	Boca/ fígado/ TGI	-----	X	Septc	728
148	Extensa	d+ 100	Boca/ fígado	d+ 1309			
152	Extensa	d+ 220	Boca/ pele/ fígado/ olho	d+ 1289			
153	Extensa	d+ 582	Boca/ pele/ fígado/ olho	d+ 1260			
177	Extensa	d+ 100	Boca/ fígado/ TGI	d+ 1127			
180	Extensa	d+ 241	Boca/ fígado	d+ 850			
203	Extensa	d+ 210	Pele/ boca/ pulmão	d+ 861			
209	Extensa	d+ 201	Boca/ fígado	d+ 718			
217	Extensa	d+ 158	Boca/ fígado/ pele/ pulmão	d+ 874			
248	Extensa	d+ 224	Boca/ fígado/ pele	d+ 550			
253	Extensa	d+ 179	Boca/ pele/ fígado	d+ 550			
258	Extensa	d+ 249	Boca/ pele/ olho	d+ 440			
259	Extensa	d+ 346	Boca/ pele/ fígado	----	X	GVHD	256
260	Localizada	d+ 100	Boca	d+ 418			
261	Localizada	d+1006	Boca	d+ 1115			
262	Extensa	d+ 248	Boca/ pele/ fígado	d+ 250			
263	Extensa	d+ 350	Boca/ fígado/ olhos/rins	d+ 368			

TGI: trato-gastro-intestinal; Septc: septicemia.

Tabela 6 - Dados clínicos dos pacientes do grupo controle

UPN	Gênero	Idade	Doença	Tipo de TMO	Doador	ABO
15	F	34	LMA	MO	Irmão (M)	Incompatível
19	M	28	AA	MO	Irmã (F)	Compatível
27	M	32	AA	MO	Irmão (M)	Compatível
53	F	10	AA	MO	Irmão (M)	Incompatível
79	F	30	LMC	MO	Irmão (M)	Incompatível
96	M	7	ABD	MO	Irmã (F)	Compatível
104	F	48	MM	MO	Irmão (M)	Compatível
122	F	25	LMC	MO	Irmã (F)	Compatível
138	M	16	LLA	MO	Irmão (M)	Incompatível
145	M	7	LLA	CTP	Irmã (F)	Compatível
157	F	18	LMC	MO	Irmã (F)	Incompatível
169	M	48	LMC	MO	Irmão (M)	Compatível
179	M	36	LMA	MO	Irmão (M)	Compatível
210	M	17	LMC	MO	Irmão (M)	Incompatível
228	M	29	LMC	MO	Irmão (M)	Incompatível
232	F	32	LMC	CTP	Irmão (M)	Incompatível

F: feminino; M: masculino; LMA; Leucemia Mielóide Aguda; AA: Anemia Aplásica; LMC: Leucemia Mielóide Crônica; ABD: Anemia Blackfound Diamond; MM: Mieloma Múltiplo; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; CTP: células tronco periféricas; MO: Medula Óssea.

Tabela 7 - Dados clínicos dos pacientes do grupo controle

UPN	Infecções	GVHDa	Órgão	d+100 pele	d+100 boca	GVHDc	Atual
15	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1812
19	VZV	Não	----	Condic	Condic	Não	d+2862
27	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1975
53	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+2240
79	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+2104
96	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1943
104	VZV/ HSV2	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1909
122	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1566
138	HSV 2	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1244
145	Não	Sim	Pele	Condic	Condic	Não	d+1264
157	HSV 2	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1205
169	CMV	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1055
179	CMV	Não	----	Condic	Condic	Não	d+1037
210	CMV	Não	----	Condic	Condic	Não	d+823
228	Não	Não	----	Condic	Condic	Não	d+635
232	VZV	Sim	TGI	Condic	Condic	Não	d+861

VZV: Varicela Zoster Vírus; HSV: Herpes Vírus Humano; CMV: Citomegalo Vírus; TGI: trato-gastro-intestinal; Cond: Condicionamento.

6 – RESULTADOS

6.1 - Resultados Clínicos

6.1.1 – Gênero dos Pacientes

No grupo-experimental, dos 25 pacientes que desenvolveram GVHDc, 16 (64%) eram do gênero masculino e nove (36%) do gênero feminino, enquanto que, no grupo-controle, nove (56%) eram do gênero masculino e sete (44%) do gênero feminino (Tabela 8 e Figura 2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos de estudos.

6.1.2 – Gênero dos Doadores

Não houve diferenças estatísticas significantes entre os gêneros dos doadores. No grupo-experimental, 12 (48%) eram do gênero masculino e 13 (52%) do gênero feminino. No grupo-controle, 11 (69%) eram do gênero masculino e cinco (31%) do gênero feminino (Tabela 9 e Figura 3).

6.1.3 – Idade dos Pacientes

A idade dos pacientes, no momento do transplante, variou, no grupo-experimental, de 14 a 54 anos, com uma média de 35 anos. No grupo-controle, a idade variou de 7 a 48 anos, com uma média de 26 anos (Tabela 10 e Figura 4). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, sendo que, no grupo-controle, os pacientes apresentaram uma idade média menor do que no grupo-experimental ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Distribuição do gênero dos pacientes nos grupos controle e experimental.

Gênero dos Pacientes	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
Masculino	9	56
Feminino	7	44
Grupo-experimental		
Masculino	16	64
Feminino	9	36

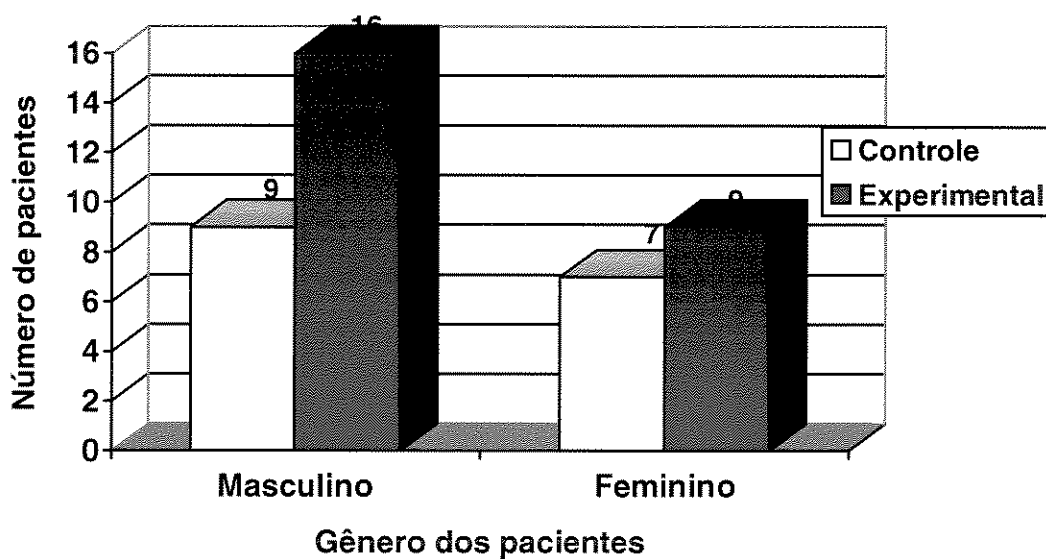


Figura 2 – Número de pacientes de acordo com o gênero masculino e feminino.

Tabela 09 – Distribuição gênero do doador no grupo-controle e no grupo-experimental.

Gênero do Doador	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
Masculino	11	69
Feminino	5	31
Grupo-experimental		
Masculino	12	48
Feminino	13	52

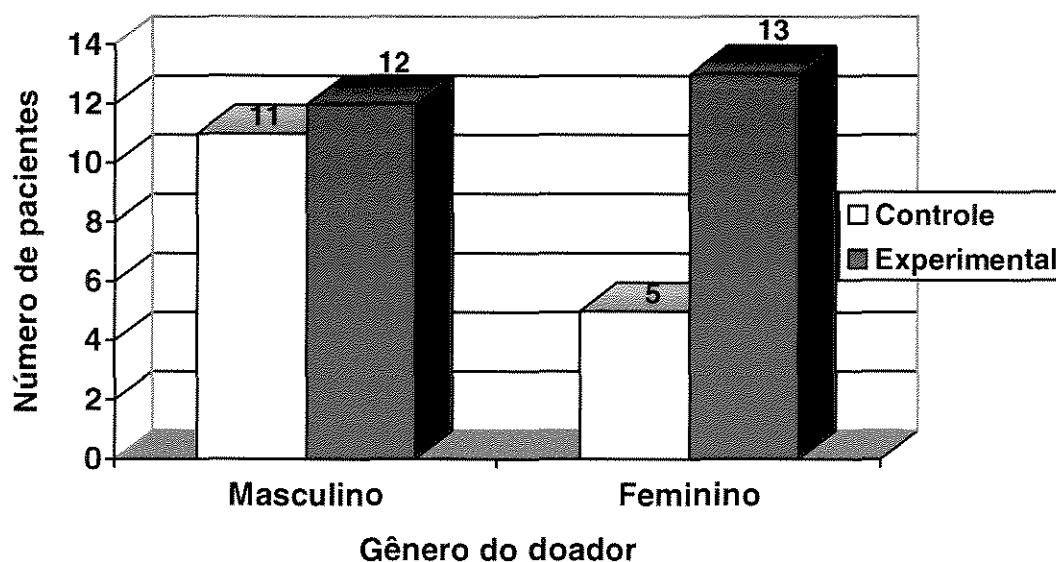
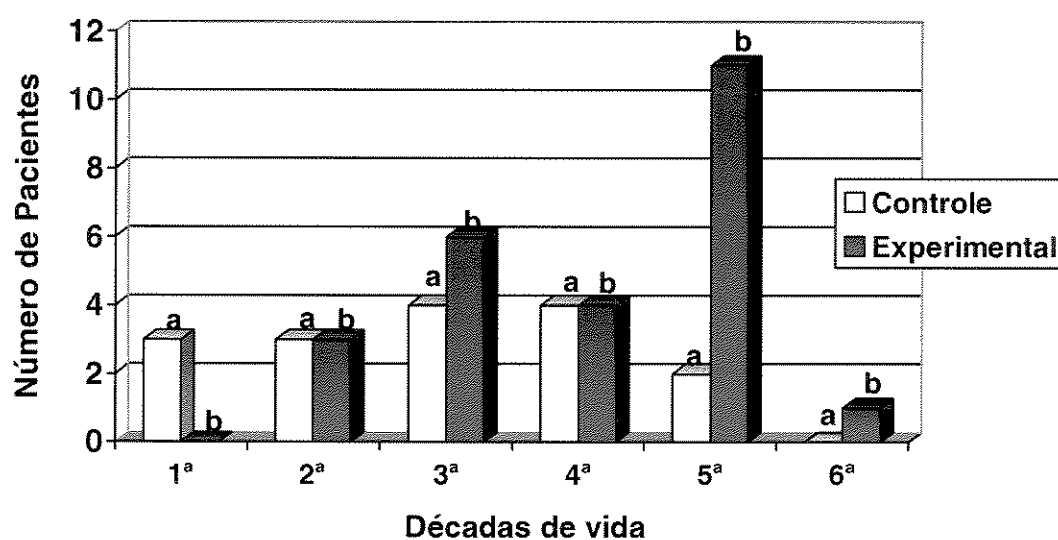


Figura 3 – Gênero do doador no grupo-controle e no grupo-experimental.

Tabela 10 – Distribuição dos pacientes quanto à idade nos grupos controle e experimental.

Faixa etária (anos)	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
0 10	3	19
11 20	3	19
21 30	4	25
31 40	4	25
41 50	2	12
Grupo-experimental		
0 10	0	0
11 20	3	12
21 30	6	24
31 40	4	16
41 50	11	44
51 60	1	4

Comparação pelo teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student para amostras independentes ($p < 0,05$).

Figura 4 – Distribuição dos pacientes do grupo-controle e grupo-experimental de acordo com a década de vida.

6.1.4 – Tipo de Transplante

Dos 25 transplantes realizados no grupo-experimental, 14 (56%) foram realizados por aspiração de células da medula óssea e 11 (44%) obtidos por aspiração de células tronco periféricas (CTP). No grupo-controle, 14 (87%) foram realizados por aspiração de células da medula e, somente dois (13%), por aspiração de células tronco periféricas (Tabela 11 e Figura 5). Quando esses dados foram cruzados, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de transplantes, sendo que nos pacientes que receberam transplante através de CTP foi observado um maior número de casos de GVHDc ($p<0,05$).

6.1.5 – Compatibilidade do Sistema ABO

Não se observou diferença estatisticamente significativa, quando analisada a compatibilidade do sistema ABO, pois, aproximadamente, metade dos pacientes era sistema ABO compatível com o seu doador, enquanto que a outra metade era incompatível com o seu doador, tanto no grupo-experimental como no grupo-controle (Tabela 12 e Figura 6).

6.1.6 – Doença de Base

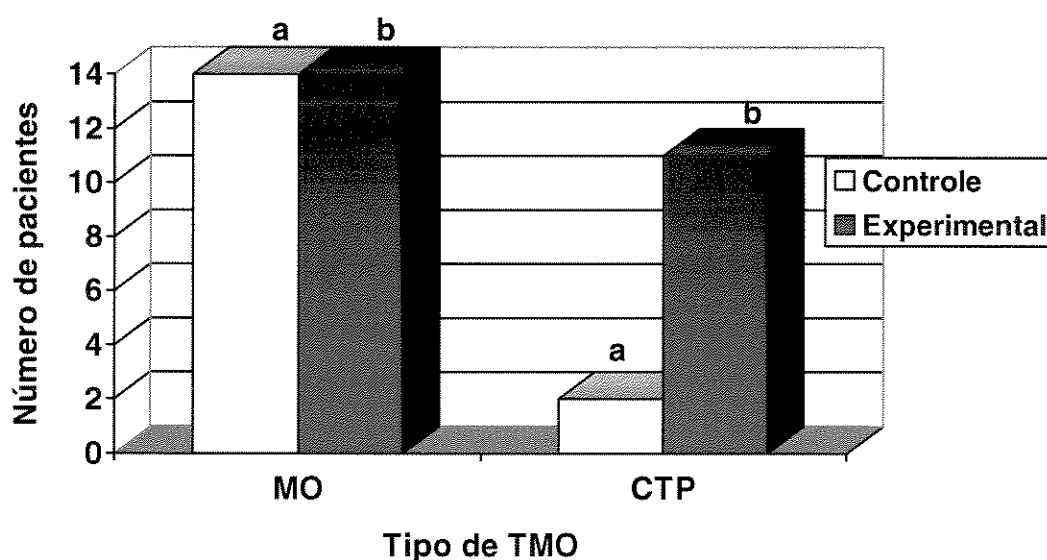
Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo-experimental e o grupo-controle em relação à doença de base que acometia os pacientes. No grupo-experimental, as doenças de base foram: 16 LMC (64%), 4 LMA (16%), 1 AA (4%), 1 LLA (4%), 1 MM (4%), 1 SMD (4%) e 1 HPN (4%)

(Tabela 13 e Figura 8). No grupo-controle as doenças de base foram: 7 LMC (43%), 3 AA (19%), 2 LMA (13%), 2 LLA (13%), 1 MM (6%) e 1 ABD (6%) (Tabela 13 e Figura 7).

Tabela 11 - Distribuição dos pacientes no grupo-controle e grupo-experimental quanto ao tipo de transplante realizado.

Tipo de TMO	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
MO	14	87
CTP	2	13
Grupo-experimental		
MO	14	56
CTP	11	44

Comparação pelo teste do qui-quadrado, $p < 0,05$



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,005$).

Figura 5 – Número de pacientes quanto ao tipo de transplante realizado no grupo-controle e no grupo-experimental.

Tabela 12 – Compatibilidade do Sistema ABO nos grupos controle e experimental.

Sistema ABO	Número de Pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
Compatível	8	50
Incompatível	8	50
Grupo-experimental		
Compatível	12	48
Incompatível	13	52

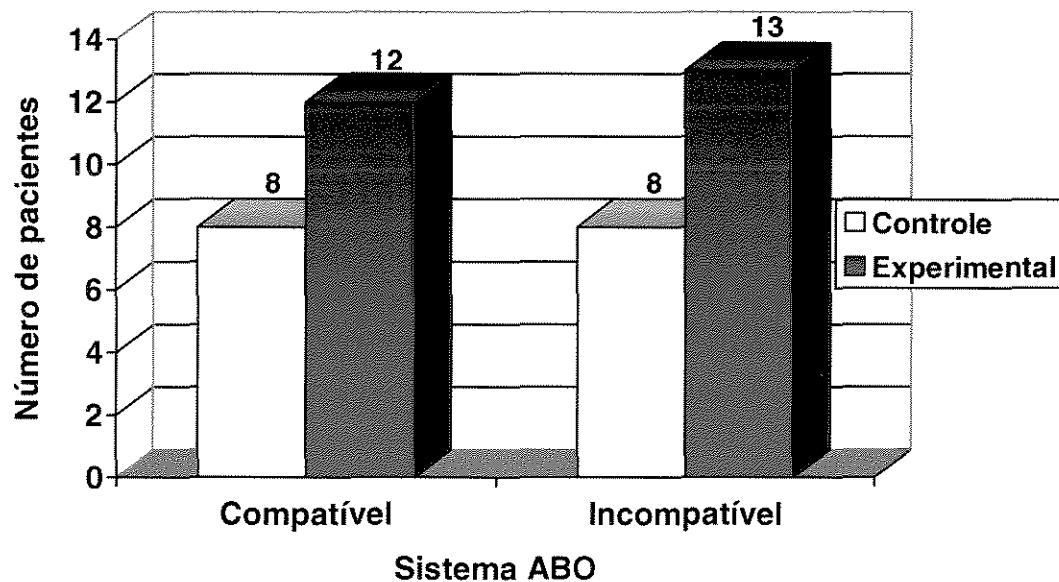


Figura 6 – Número de pacientes em relação à compatibilidade do sistema ABO no grupo-controle e no grupo-experimental.

Tabela 13 – Número de pacientes em relação à doença de base no grupo-controle e no grupo-experimental.

Doença de Base	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
LMC	7	43
AA	3	19
LMA	2	13
LLA	2	13
MM	1	6
ABD	1	6
Grupo-experimental		
LMC	16	64
LMA	4	16
AA	1	4
LLA	1	4
MM	1	4
SMD	1	4
HPN	1	4

SMD: Síndrome Miélo-Displásica; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LMC: Leucemia Mielóide Crônica; AA: Anemia Aplásica; MM: Mieloma Múltiplo; HPN: Hemoglobinúria paroxística noturna; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; CTP: células tronco periféricas; MO: medula óssea; ABD: Anemia Blackfound Diamond

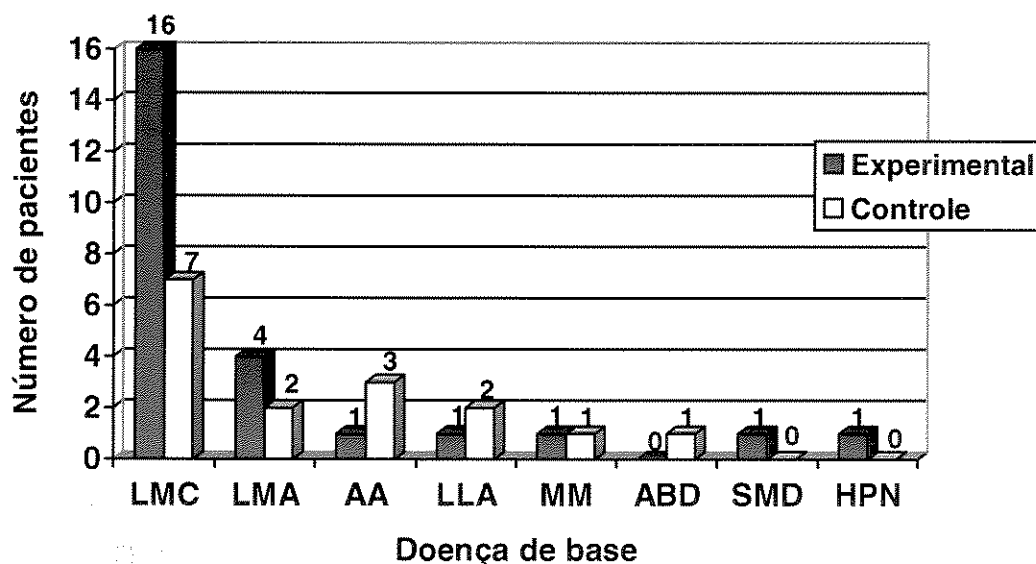


Figura 7 - Número de pacientes quanto à doença de base.

6.1.7 – Presença Prévia de GVHDa

A presença prévia de GVHDa não demonstrou ser um fator prognóstico para o desenvolvimento de GVHDc, pois não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo-experimental e o grupo-controle. No grupo-experimental, apenas 3 pacientes (12%) desenvolveram GVHDa (Tabela 14 e Figura 8), sendo um caso envolvendo a pele (33%), um caso envolvendo o TGI (33%) e um caso acometendo tanto a pele quanto o TGI (34%) (Tabela 15 e Figura 9). No grupo-controle, dois pacientes (13%) desenvolveram GVHDa (Tabela 14 e Figura 8), sendo um caso em pele (50%) e um em TGI (50%) (Tabela 15 e Figura 9).

6.1.8 – Presença de Infecções Virais

A presença ou ausência de infecções virais foi um fator estatisticamente significativo para o desenvolvimento de GVHDc, ($p < 0,01$). No grupo-experimental, 23 pacientes (92%) tiveram algum tipo de infecção viral; já no grupo-controle, oito pacientes (50%) tiveram infecções. No entanto, o tipo de infecção não foi um fator significativo para o desenvolvimento de GVHDc, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre o grupo-experimental e o grupo-controle. Em ambos os grupos, a infecção mais freqüente foi CMV, seguida pelo HSV e VZV (Tabelas 16 e 17 e Figuras 10 e 11).

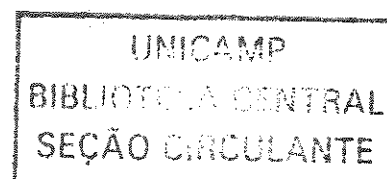


Tabela 14 – Número de pacientes quanto à frequência de GVHDa no grupo-controle e grupo-experimental.

GVHDa	Número de pacientes	Porcentagem
Grupo-controle		
Sim	2	13
Não	14	87
Grupo-experimental		
Sim	3	12
Não	22	88

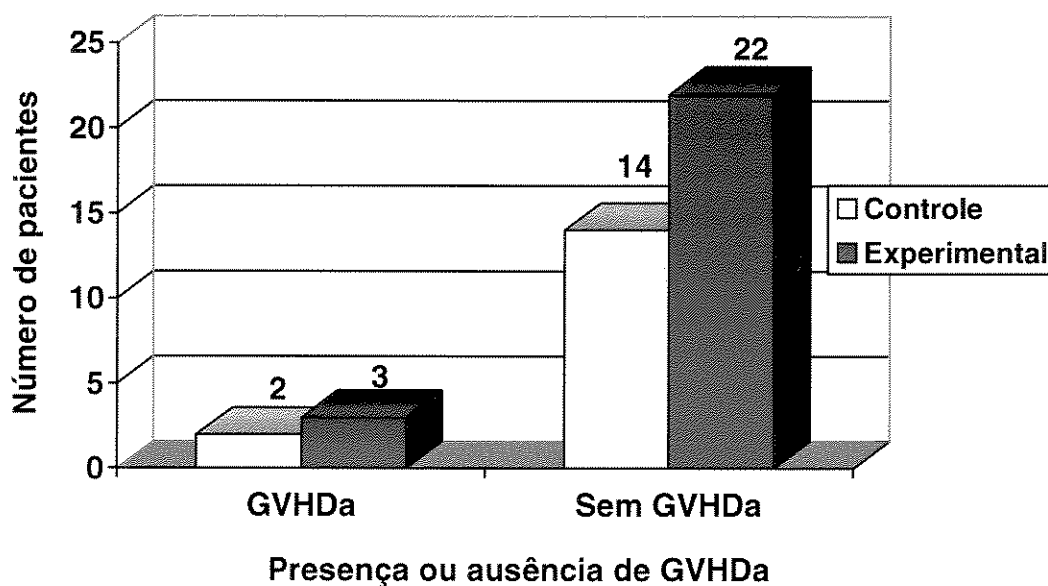


Figura 8 – Número de pacientes quanto à presença e ausência de GVHDa no grupo-controle e no grupo-experimental.

Tabela 15 – Relação entre o número de pacientes no grupo-controle e no grupo-experimental quanto ao envolvimento de outros órgãos.

Órgãos acometidos	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
Pele	1	50
TGI	1	50
Grupo-experimental		
Pele	1	33
TGI	1	33
Pele/TGI	1	34

TGI: Trato Gastrointestinal

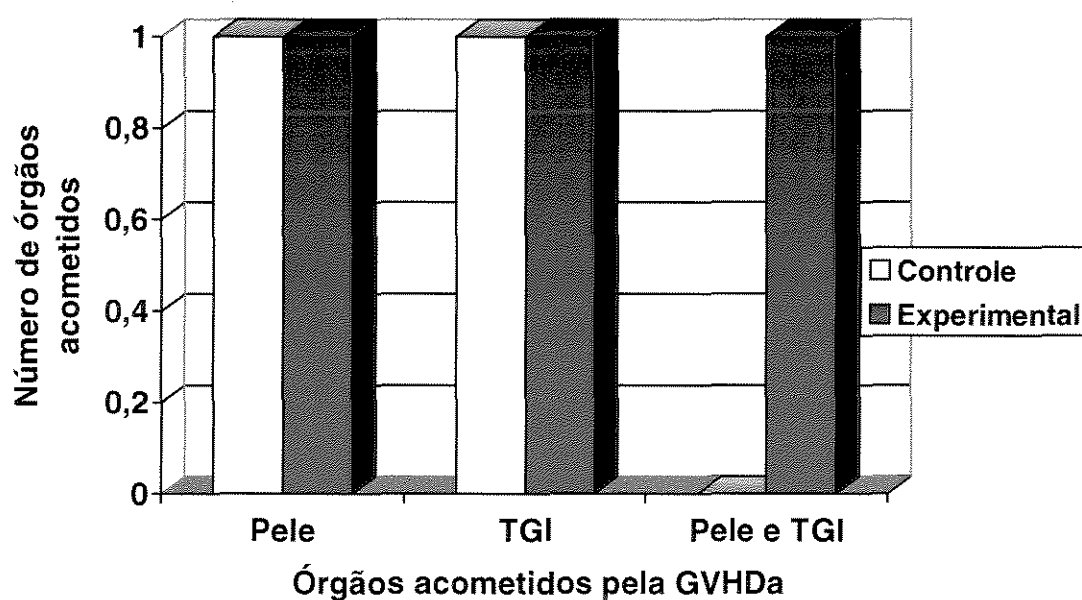
**Figura 9** – Relação entre o número de pacientes com GVHDA do grupo-controle e grupo-experimental e envolvimento de outros órgãos.

Tabela 16 – Número de pacientes em relação ao tipo de infecção pós-TMO no grupo-experimental.

Infecções Pós - TMO	Número de Pacientes	Porcentagem
Sem infecções	2	8
CMV	9	36
HSV	5	20
VZV	3	12
VZV/ CMV	2	8
HSV/ HPV	1	4
HSV/ CMV/ VZV	1	4
HSV / CMV	2	8
TOTAL	25	100

HSV: Herpes Simples Vírus; CMV: Citomegalovírus; VZV: Varicela-Zoster Vírus; HPV: Papiloma Virus Humano

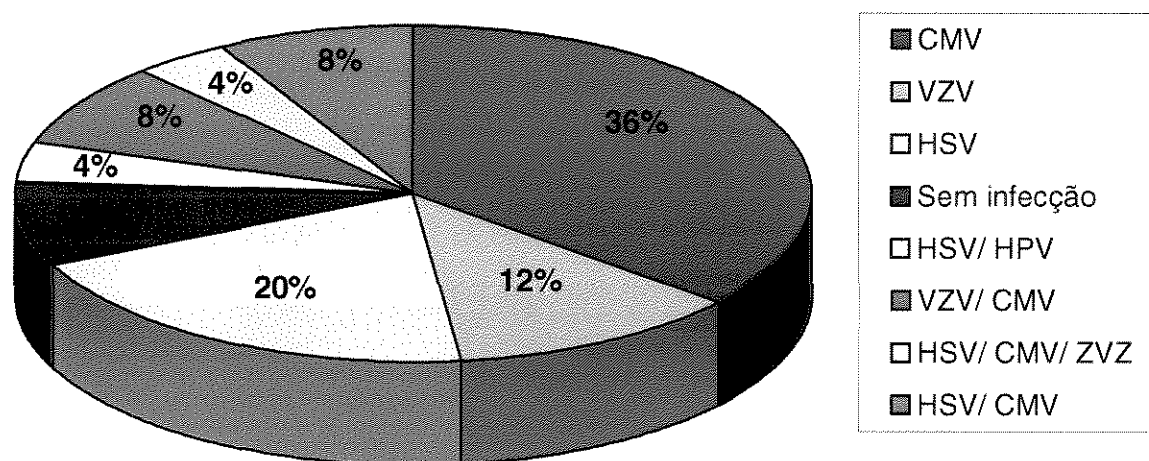


Figura 10 – Porcentagem de pacientes em relação ao tipo de infecção pós-TMO no grupo-experimental.

Tabela 17 - Número de pacientes em relação ao tipo de infecções pós-TMO do grupo-controle

Infecções Pós - TMO	Número de Pacientes	Porcentagem
Sem infecções	8	46
HSV	2	12
CMV	4	24
VZV	2	12
VZV/ HSV	1	6
TOTAL	16	100

HSV: Herpes Simples Vírus; CMV: citomegalovírus; VZV: Varicela-Zoster Vírus

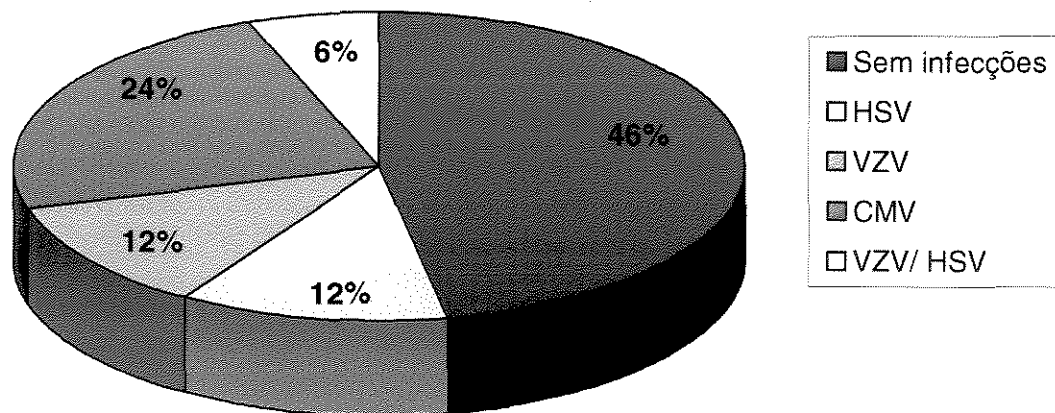


Figura 11 – Porcentagem de pacientes que apresentaram infecção pós-TMO no grupo-controle.

6.1.9 – Classificação Clínica da Extensão da GVHDc

Dentre os 25 pacientes que desenvolveram GVHDc, 22 (88%) apresentaram a forma extensa da doença, e três (12%) tiveram a forma localizada da doença (Tabela 18 e Figura 12). Os órgãos mais acometidos foram boca, fígado e pele (Tabela 19 e Figura 13).

6.1.10 – Média do Dia do Diagnóstico

As lesões em cavidade oral foram diagnosticadas entre o dia 100 e 1006 pós-transplante com uma média de 265 dias.

6.1.11 – Situação Clínica Atual

Todos os pacientes foram acompanhados regularmente após o transplante. De acordo com a última informação obtida nos prontuários, todos os pacientes do grupo-controle estavam vivos, e, no grupo-experimental, quatro (16%) evoluíram para o óbito (Tabela 20 e Figura 14). Dentre estes quatro que evoluíram para o óbito, dois deles foram devido a GVHDc e dois deles devido à septicemia. Esses dados foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) pois no grupo-controle nenhum paciente evoluiu para o óbito, indicando uma sobrevida superior ao do grupo-experimental (Figura 15).

Tabela 18 - Classificação clínica da extensão da GVHDc

GVHDc	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Localizada	3	12
Extensa	22	88
TOTAL	25	100

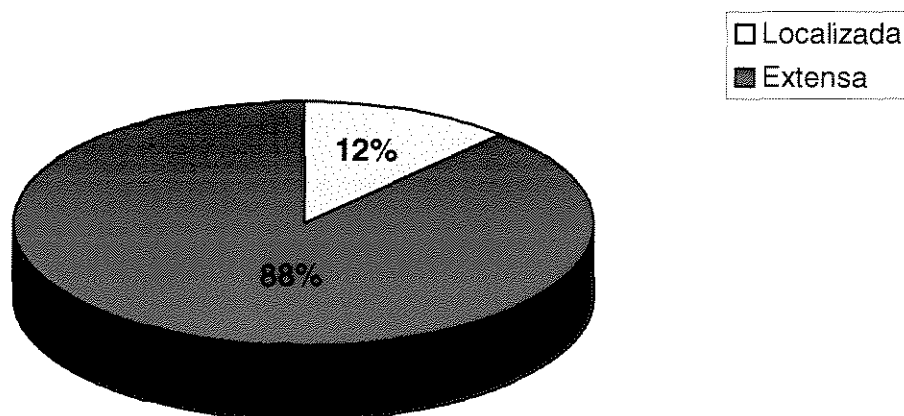
**Figura 12** – Porcentagem de pacientes que apresentaram GVHDc extensa e localizada no grupo-experimental

Tabela 19 – Relação entre o número de pacientes, do grupo-experimental, acometidos por GVHDc e o envolvimento de órgãos.

Órgãos acometidos	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Boca/ Fígado	5	20
Boca/ Fígado/ Pele	5	20
Boca/ Pele/ Fígado/ Olho	4	16
Boca	3	12
Boca/ Pele/ Olho	2	8
Boca/ Fígado/ TGI	2	8
Boca/ Fígado/ Olho	1	4
Boca/ Pele/ Pulmão	1	4
Boca/ Fígado/ Pele/ Pulmão	1	4
Boca/ Fígado/ Olhos/ Rins	1	4
TOTAL	25	100

TGI: Trato gastrointestinal

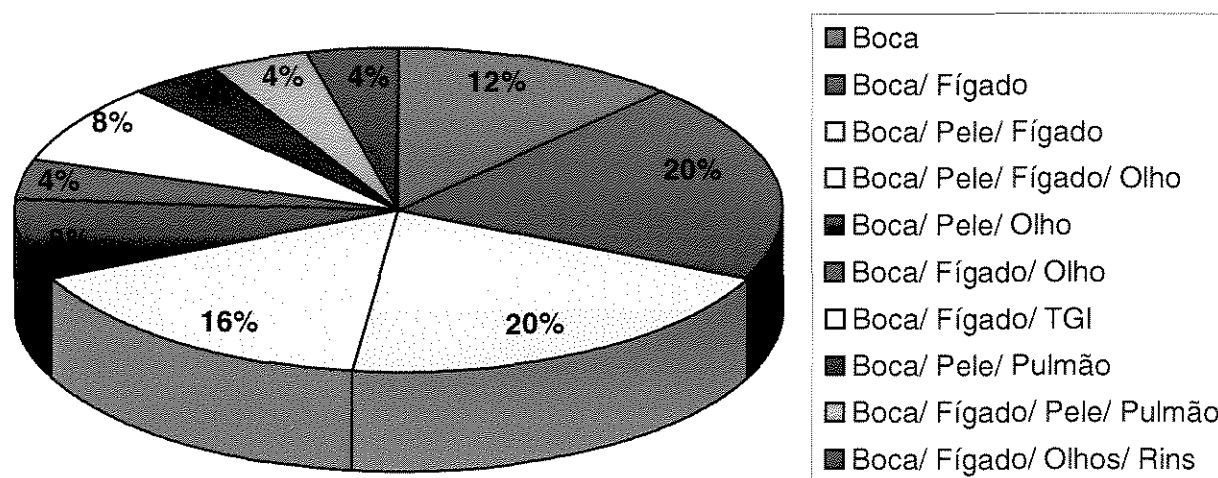
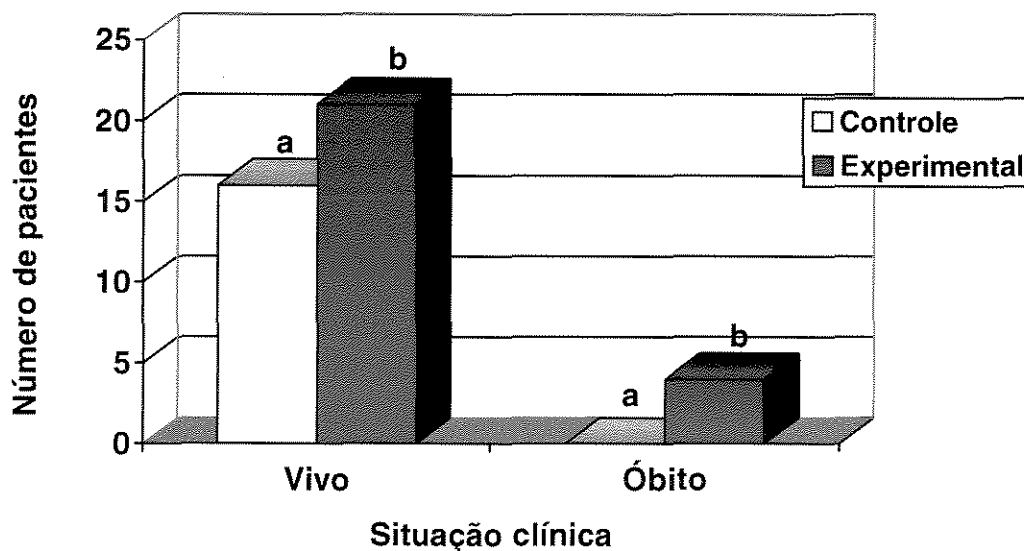


Figura 13 – Porcentagem de pacientes do grupo-experimental acometidos por GVHDc e envolvimento de órgãos

Tabela 20 – Número de pacientes vivos e mortos no grupo-controle e grupo-experimental.

Situação Atual	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Grupo-controle		
Óbito	0	0
Vivo	16	100
Grupo-experimental		
Óbito	4	16
Vivo	21	84

Comparação pelo teste Kaplan –Meier e log-rank, $p < 0,05$



Barras com letras distintas entre si diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Kaplan-Meier, complementado pelo teste de log-rank ($p < 0,05$)

Figura 14 – Situação clínica atual dos pacientes do grupo-controle e grupo-experimental.

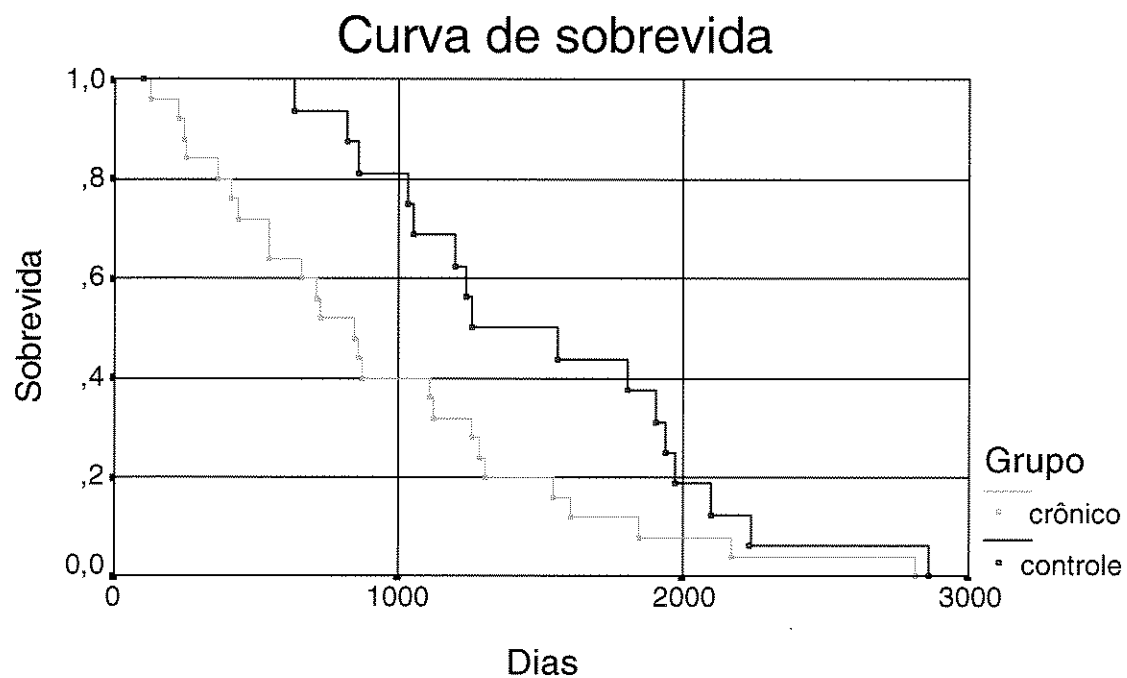


Figura 15 - Curva de sobrevida dos pacientes do grupo-experimental e do grupo-controle.

6.2 - Resultados Histológicos

6.2.1 - Mucosa Oral

Os achados histológicos da mucosa oral no grupo-experimental e no grupo-controle, demonstraram valores diferentes que foram estatisticamente significantes para todos os critérios histopatológicos da classificação de Horn.

Na mucosa oral do grupo-experimental, do total de 25 pacientes, em 22 (88%) casos a mucosa oral estava presente para análise no material da biópsia e, no grupo-controle, do total de 16 pacientes, em 14 (87%) casos a mucosa oral estava presente (Tabelas 21 e 22).

A vacuolização da camada basal apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo-experimental e o grupo-controle, com $p < 0,01$, pois no grupo-controle 13 (93%) casos não apresentaram vacuolização da camada basal. Já no grupo-experimental, apenas seis (27%) casos não mostravam vacuolização da camada basal (Tabelas 21 e 22 e Figuras 16 e 19).

O infiltrado linfóide estava ausente em sete (50%) dos casos no grupo-controle. Já no grupo-experimental, a maioria do infiltrado foi classificada como moderado (11 casos – 50%). Houve uma diferença estatisticamente significativa com um $p < 0,01$ (Tabelas 21 e 22 e Figuras 17 e 19).

Em relação ao grau de exocitose, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo-controle e o grupo-experimental. No grupo-controle, a maioria dos casos (oito casos – 57%) não apresentava

exocitose. Já no grupo-experimental, 11 casos (50%) apresentavam exocitose moderada (Tabelas 21 e 22 e Figuras 18 e 19).

Células acidófilas, clivagem focal e clivagem extensa entre o epitélio e o tecido conjuntivo não foram observadas em nenhum caso do grupo-controle (Tabela 22). No grupo-experimental, muitos casos (10 casos – 45%) apresentavam mucosa com número moderado de células acidófilas contraídas. Em sete (32%) pacientes, havia clivagem focal entre o epitélio e o conjuntivo e, num paciente (5%), clivagem extensa entre o epitélio e o conjuntivo (Tabela 21 e Figuras 20 e 21).

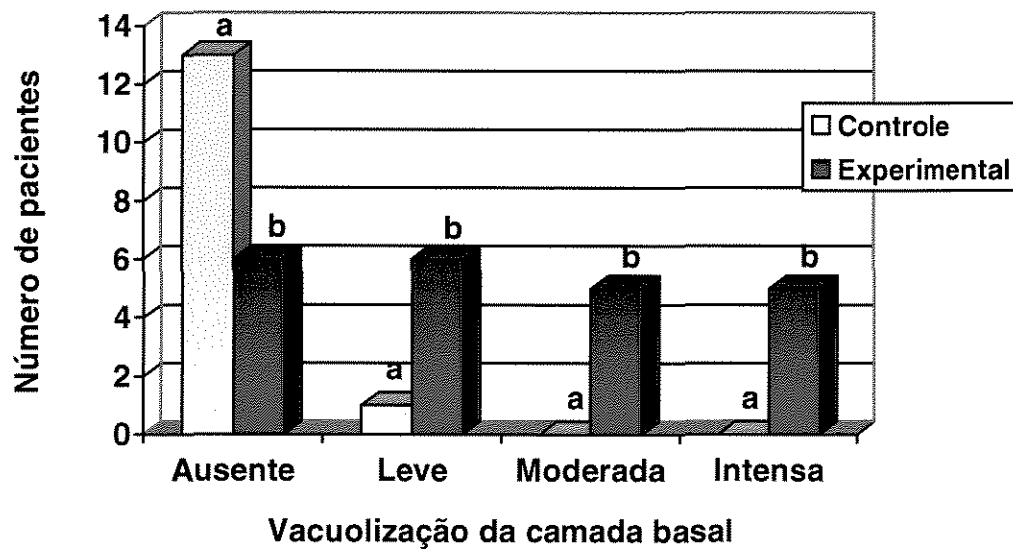
No grupo-experimental, dos 22 pacientes em que a mucosa estava presente, cinco (23%) não mostravam sinais de GVHDc na biópsia com fins diagnósticos. Nove (40%) apresentavam GVHDc grau II, sete (32%) apresentavam GVHDc grau III e um (5%) apresentava GVHDc grau IV (Tabela 23 e Figura 22). No grupo-controle não foi observado nenhum caso de GVHDc subclínico em mucosa oral.

Tabela 21: Características histopatológicas do grupo-experimental mucosa oral.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	(%)
Mucosa Oral Disponível		
Sim	22	88
Não	3	12
Vacuolização das células basais		
Ausente	6	27
Leve	6	27
Moderada	5	23
Intensa	5	23
Infiltrado inflamatório linfocitário		
Ausente	2	9
Leve	7	32
Moderado	11	50
Intenso	2	9
Exocitose epitelial		
Ausente	3	50
Leve	6	27
Moderada	11	14
Intensa	2	9
Células acidófilas contraídas		
Ausentes	5	23
Leve	4	18
Moderado	10	45
Intenso	3	14
Clivagem focal		
Ausente	15	68
Presente	7	32
Separação entre epitélio e conjuntivo		
Ausente	21	95
Presente	1	5

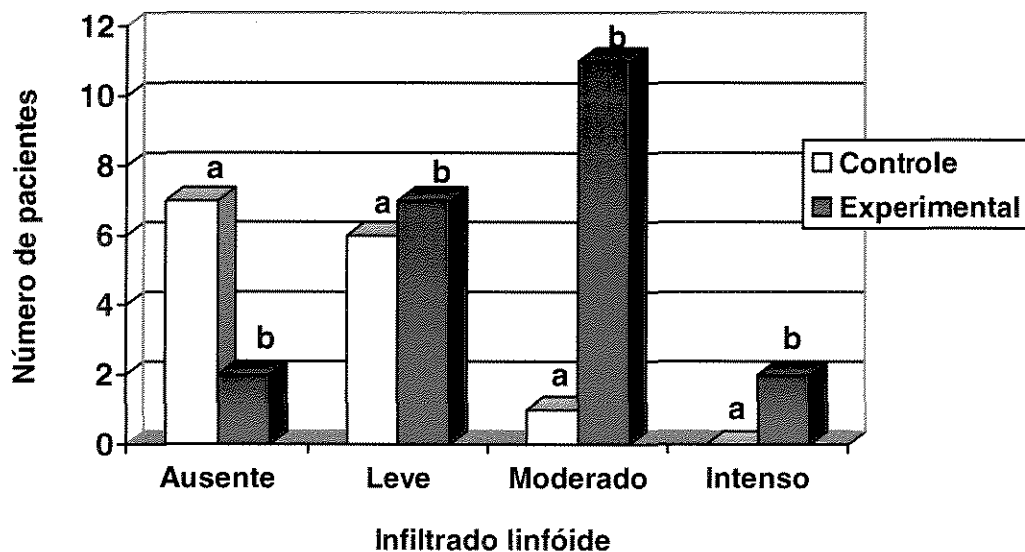
Tabela 22: Características histológicas do grupo-controle- mucosa oral.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	(%)
Mucosa Oral Disponível		
Sim	14	87
Não	2	13
Vacuolização das células basais		
Ausente	13	93
Leve	1	7
Moderada	0	0
Intensa	0	0
Infiltrado inflamatório linfocitário		
Ausente	7	50
Leve	6	43
Moderado	1	7
Intenso	0	0
Exocitose epitelial		
Ausente	8	57
Leve	5	36
Moderada	1	7
Intensa	0	0
Células acidófilas contraídas		
Ausente	14	100
Leve	0	0
Moderado	0	0
Intenso	0	0
Clivagem focal		
Ausente	14	100
Presente	0	0
Separação entre epitélio e conjuntivo		
Ausente	14	100
Presente	0	0



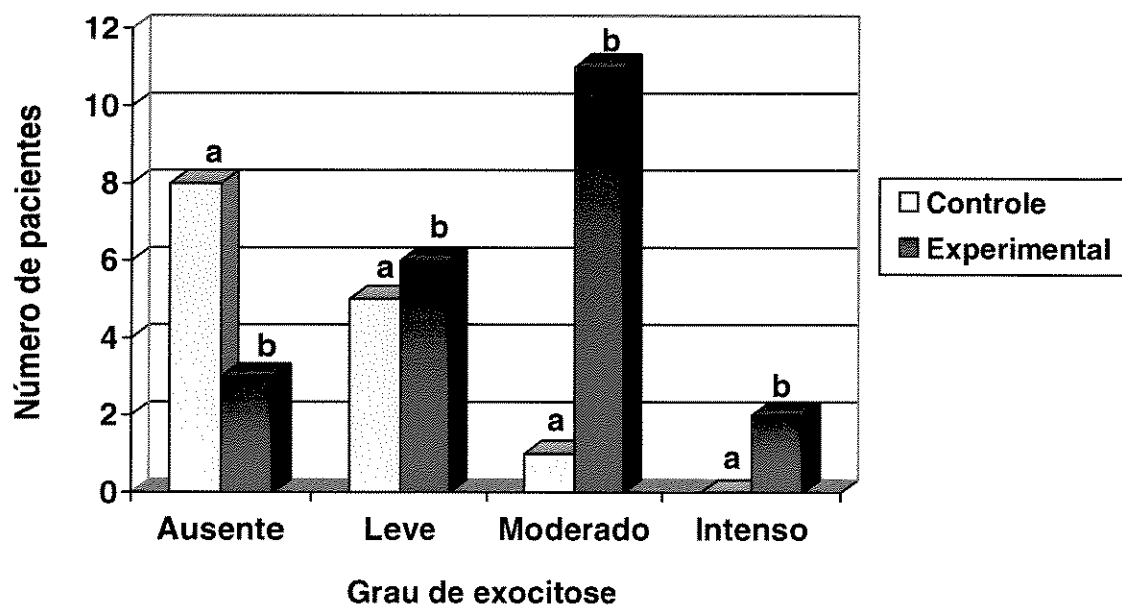
Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,01$).

Figura 16 – Intensidade de vacuolização da camada basal no grupo-controle e grupo-experimental.



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,01$).

Figura 17 – Intensidade do infiltrado inflamatório no grupo-controle e grupo-experimental.



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,01$).

Figura 18 - Grau de exocitose na mucosa no grupo-controle e grupo-experimental.

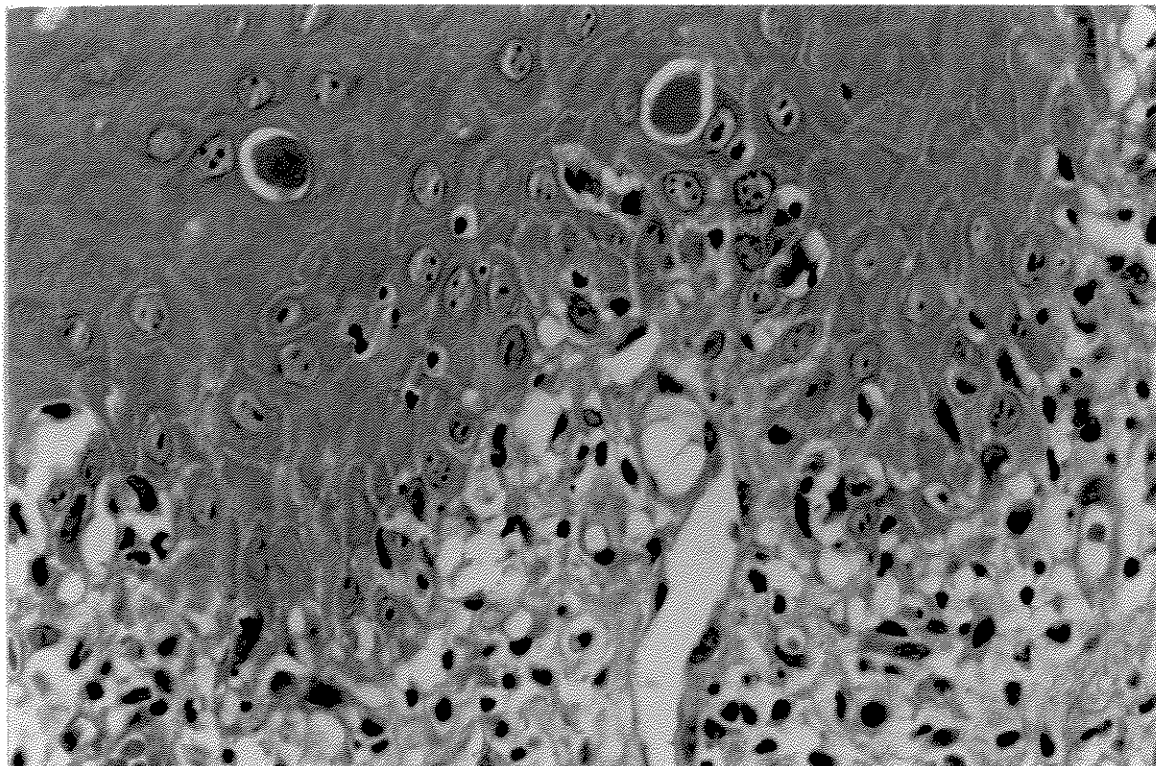


Figura 19 – Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos da GVHDc grau II, mostrando infiltrado inflamatório, exocitose e corpos apoptóticos com presença de linfócitos (H&E, 400X).

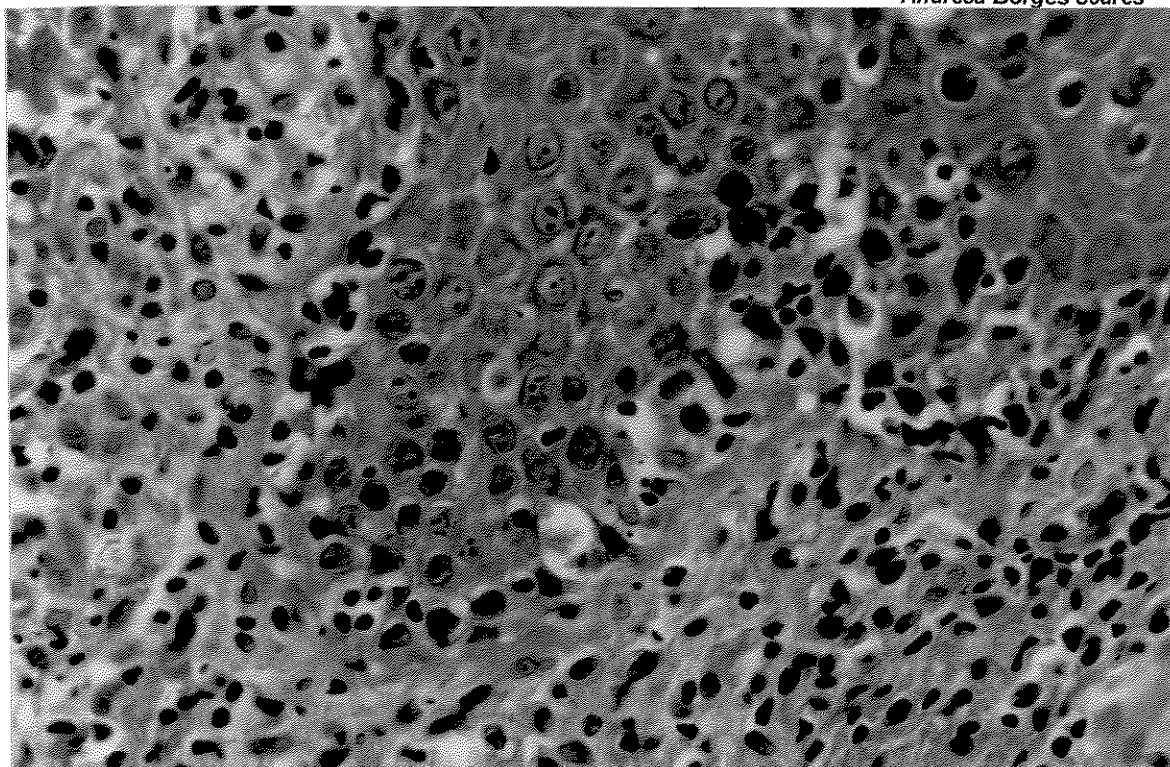


Figura 20 – Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos de GVHDc grau III, mostrando infiltrado inflamatório crônico intenso, exocitose e um início de clivagem focal entre o epitélio e o conjuntivo (H&E - 400X).

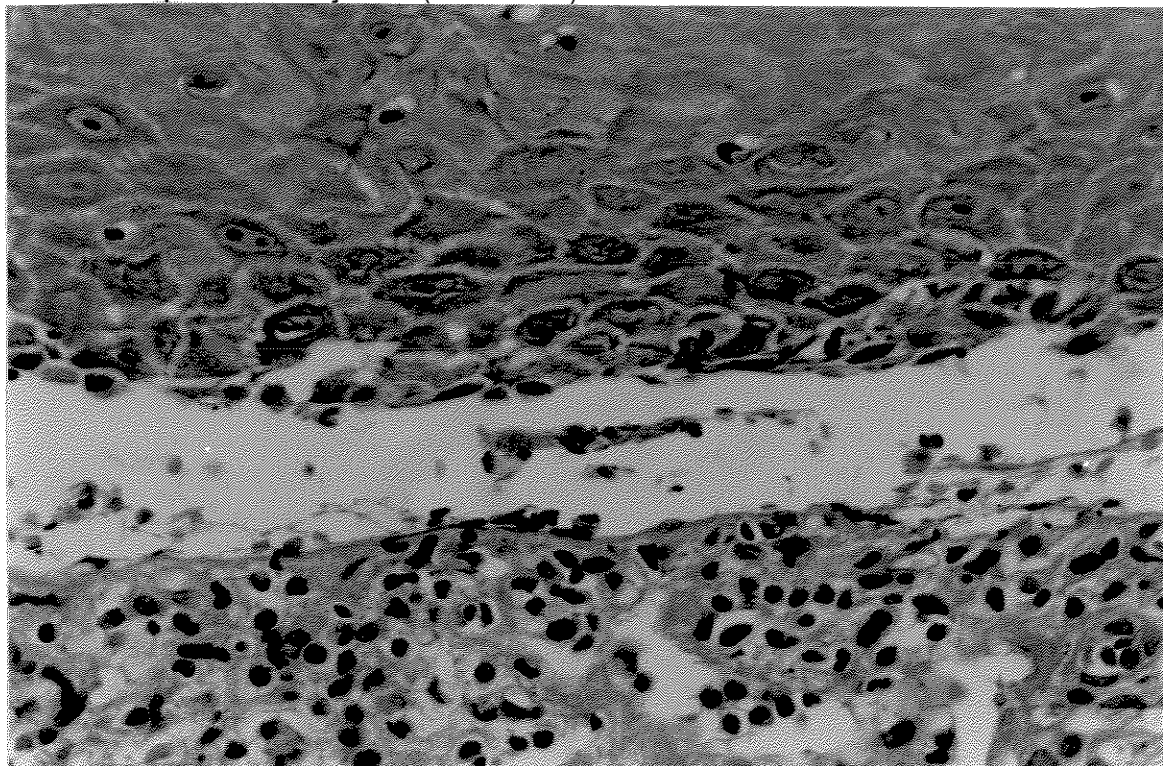


Figura 21 – Corte histológico da mucosa oral com sinais morfológicos de GVHDc grau IV, mostrando tecido subepitelial com intenso infiltrado inflamatório crônico e clivagem total entre o epitélio e o conjuntivo (H&E - 400X).

Tabela 23 – Classificação histológica da GVHDc em mucosa oral do grupo-experimental.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	(%)
GVHDc		
Ausente	5	23
Grau I	0	0
Grau II	9	40
Grau III	7	32
Grau IV	1	5

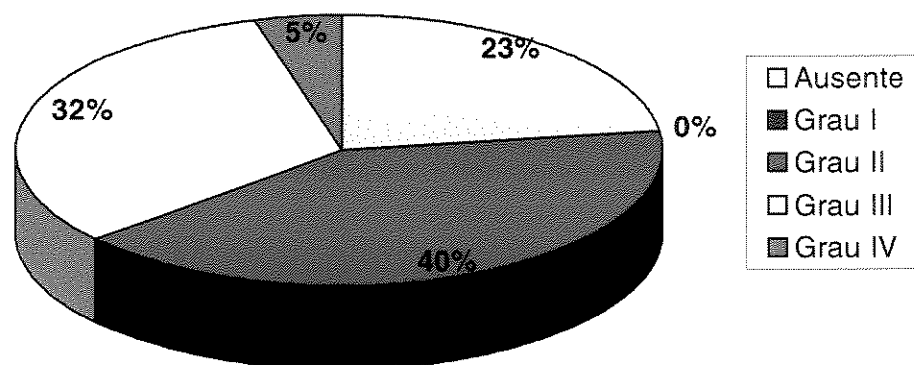


Figura 22 – Classificação histológica da GVHDc no grupo-experimental.

6.2.2 - Glândulas Salivares

Na avaliação histológica das glândulas salivares menores, tanto no grupo-experimental como no grupo-controle, foram estudadas as alterações segundo a classificação histopatológica de GVHDc de Horn.

O infiltrado linfóide apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo-experimental e o grupo-controle, com $p < 0,01$, pois no grupo-controle 10 (63%) casos apresentaram um infiltrado linfóide do tipo leve; já no grupo-experimental, 15 (60%) casos apresentaram um infiltrado linfóide do tipo moderado (Tabela 24 e 25 e Figura 23).

Houve diferença estatística no grau de diminuição do número de ductos e ácinos salivares entre os grupos. No grupo-controle, 10 pacientes (62%) não apresentaram diminuição do número dos ductos e ácinos, e apenas seis pacientes (38%) apresentaram diminuição de grau leve (Tabela 25 e Figura 24). No grupo-experimental, em quatro pacientes (16%) não houve diminuição numérica de ductos e ácinos, sete (28%) mostraram diminuição de grau leve, 13 (52%) apresentaram diminuição de grau moderado e em apenas um caso (4%) houve diminuição intensa (Tabela 24 e Figura 24).

O grau de dilatação ductal não se apresentou estatisticamente significativa na comparação dos dois grupos (Tabelas 24 e 25 e Figura 25).

O grau de fibrose intersticial mostrou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). No grupo-controle, 10 pacientes (62%) não apresentaram nenhum grau de fibrose intersticial e seis pacientes (38%) mostraram fibrose leve. No grupo-experimental, seis pacientes (24%) não apresentaram fibrose intersticial, nove

(36%) apresentaram uma fibrose leve, nove (36%) uma fibrose moderada e um (4%) uma fibrose intensa (Tabelas 24 e 25 e Figura 26).

No grupo-experimental, cinco (20%) pacientes foram classificados como GVHDc grau I em glândulas salivares menores, 10 (40%) como GVHDc grau II, oito (32%) apresentavam GVHDc grau III e dois (8%) apresentava GVHDc grau IV (Tabela 28 e Figura 25). No grupo-controle, 14 (87%) não apresentaram sinais histológicos próprios a GVHDc. Contudo, dois (13%) mostraram alterações histopatológicas compatíveis com GVHDc grau II (Tabela 28 e Figura 25).

6.2.3 – Correlação entre dia do diagnóstico e o grau histológico de GVHDc em mucosa e glândulas salivares menores.

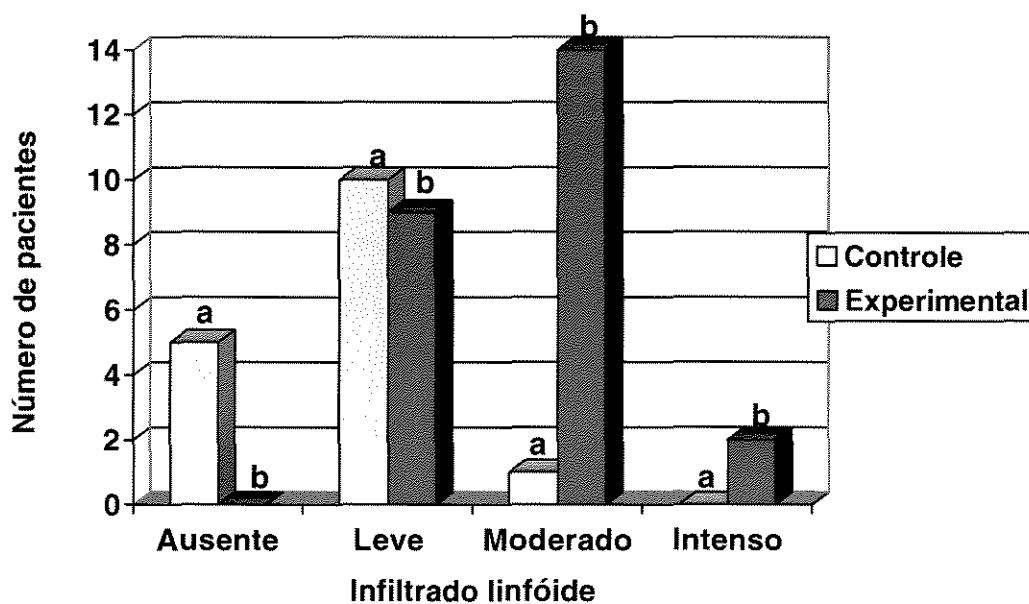
Houve uma correlação estatística ($p < 0,05$) entre o dia de diagnóstico e o grau de envolvimento da mucosa, ou seja, quanto mais tarde o dia do diagnóstico maior comprometimento era observado na mucosa. Não houve nenhuma correlação estatística entre o dia de diagnóstico e o grau de envolvimento histológico nas glândulas salivares.

Tabela 24 – Características histopatológicas de GVHDc em glândulas salivares menores no grupo-experimental.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	%
Infiltrado Inflamatório linfocitário		
Ausente	0	0
Leve	9	36
Moderado	14	56
Intenso	2	8
Diminuição do nº de ácinos		
Ausente	4	16
Leve	7	28
Moderada	13	52
Intensa	1	4
Dilatação ductal		
Ausente	5	20
Leve	10	40
Moderada	8	32
Intensa	2	8
Metaplasia Escamosa		
Presente	2	92
Ausente	23	8
Fibrose Intersticial		
Ausente	7	28
Leve	9	36
Moderada	8	32
Intensa	1	4
TOTAL	25	100

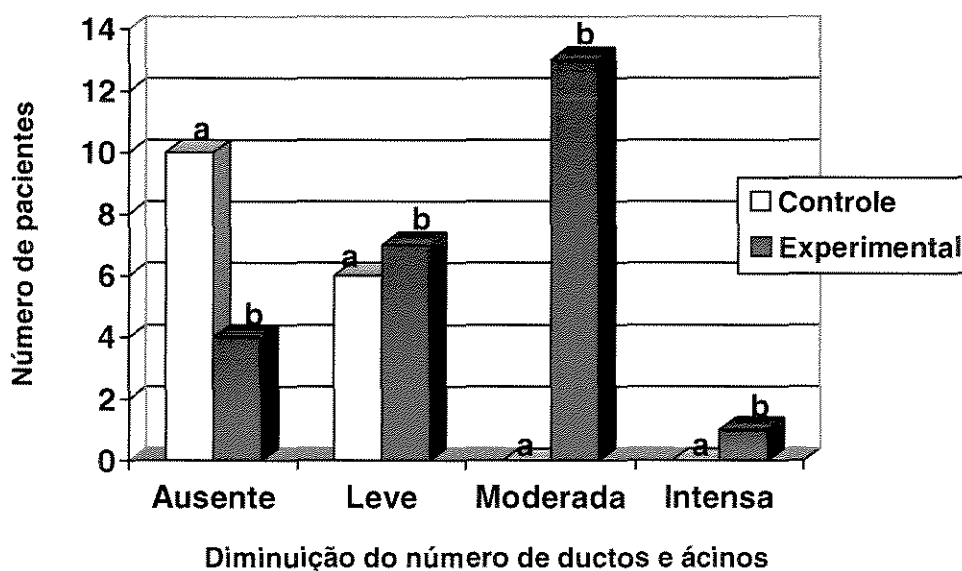
Tabela 25 - Características histopatológicas de GVHDc em glândulas salivares menores no grupo-controle.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	%
Infiltrado Inflamatório linfocitário		
Ausente	5	31
Leve	10	63
Moderado	1	6
Intenso	0	0
Diminuição do n° de ácinos		
Ausente	10	62
Leve	6	38
Moderada	0	0
Intensa	0	0
Dilatação ductal		
Ausente	5	31
Leve	8	50
Moderada	3	19
Intensa	0	0
Metaplasia Escamosa		
Presente	0	0
Ausente	16	100
Fibrose Intersticial		
Ausente	10	62
Leve	6	38
Moderada	0	0
Intensa	0	0
TOTAL	16	100



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,001$).

Figura 23 – Infiltrado inflamatório nas glândulas salivares no grupo-controle e grupo-experimental.



Barras com letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,01$).

Figura 24 – Grau de diminuição do número de ductos e ácinos no grupo-controle e grupo-experimental.

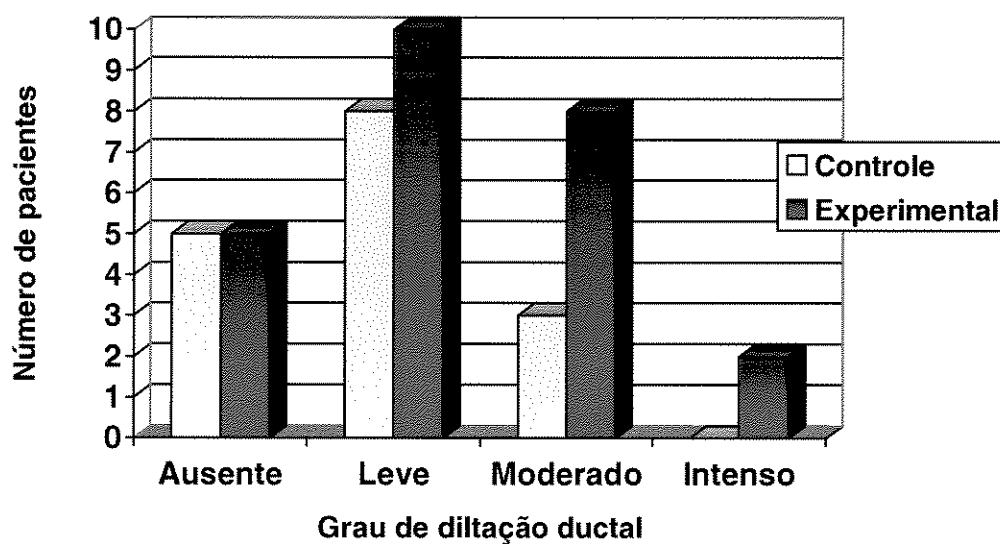
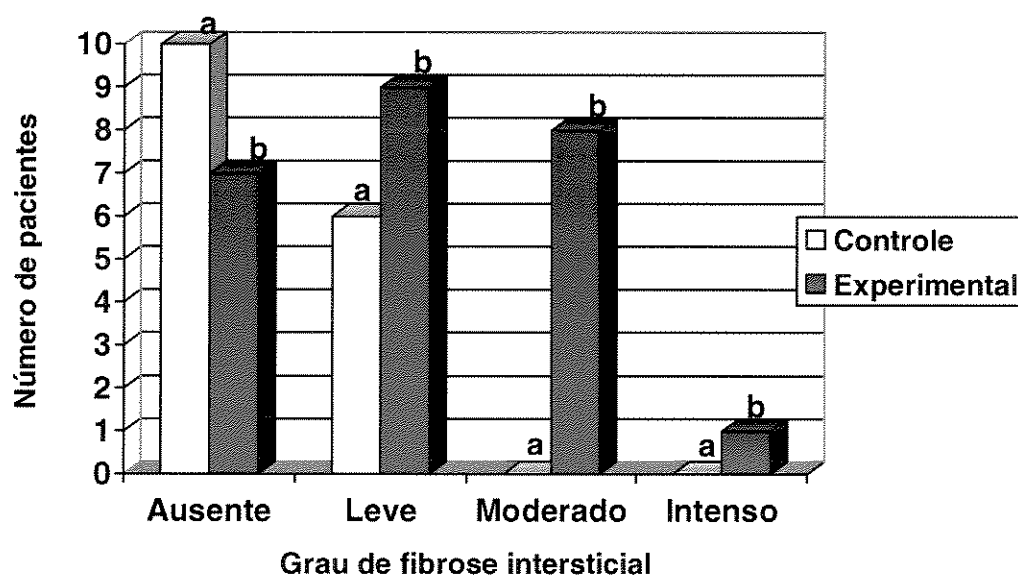


Figura 25 – Grau de dilatação ductal no grupo-controle e grupo-experimental.

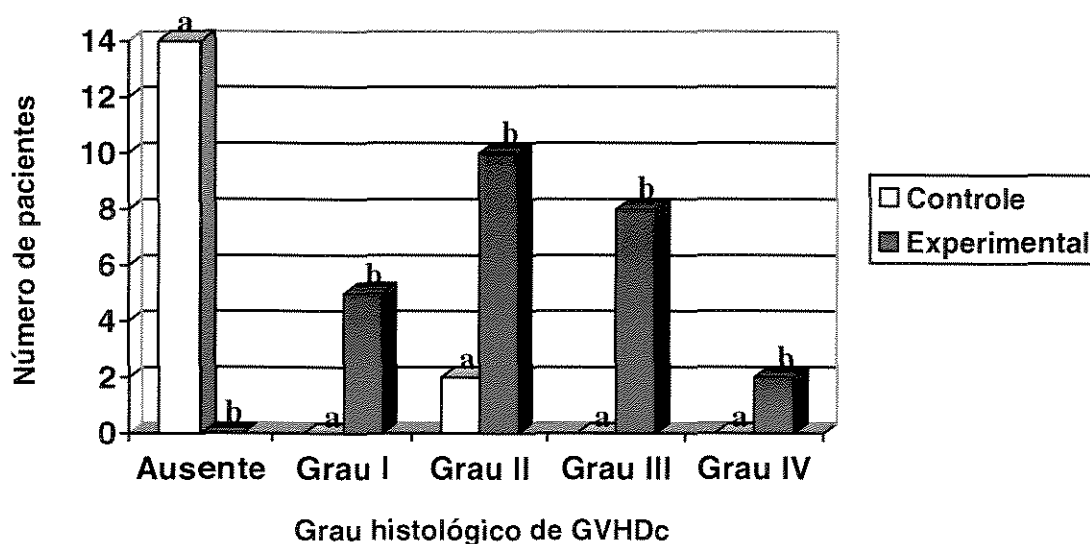


Barras com letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

Figura 26 – Grau de fibrose no grupo-controle e grupo-experimental.

Tabela 26 – Classificação Histológica da GVHDc em glândulas salivares nos grupos controle e experimental.

Alterações Histológicas	Número de pacientes	%
GVHDc Grupo-controle		
Ausente	14	88
Grau I	0	0
Grau II	2	12
Grau III	0	0
Grau IV	0	0
GVHDc Grupo-experimental		
Ausente	0	0
Grau I	5	20
Grau II	10	40
Grau III	8	32
Grau IV	2	8



Barras com letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,001$).

Figura 27 – Grau histológico de GVHDc em glândulas salivares no grupo-controle e grupo-experimental.

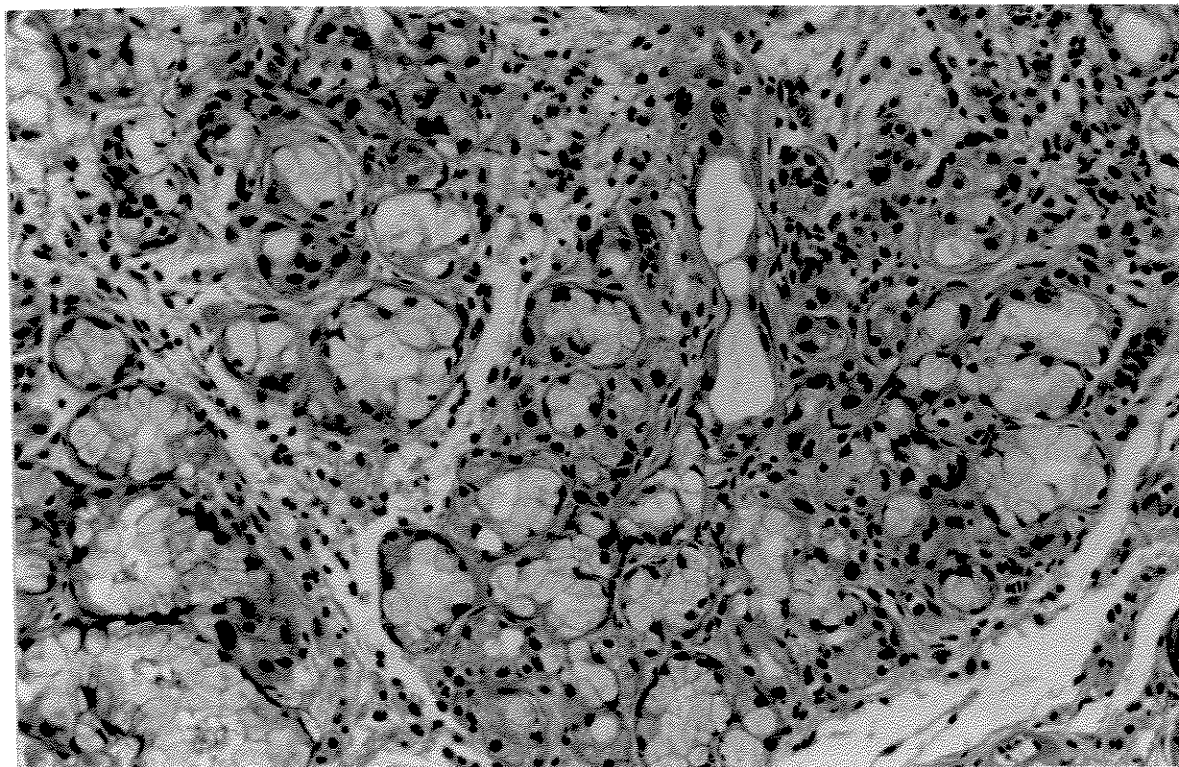


Figura 28 - Corte histológico de glândulas salivares menores com alterações morfológicas de GVHDc grau II, mostrando infiltrado inflamatório intersticial leve (H&E - 200X).

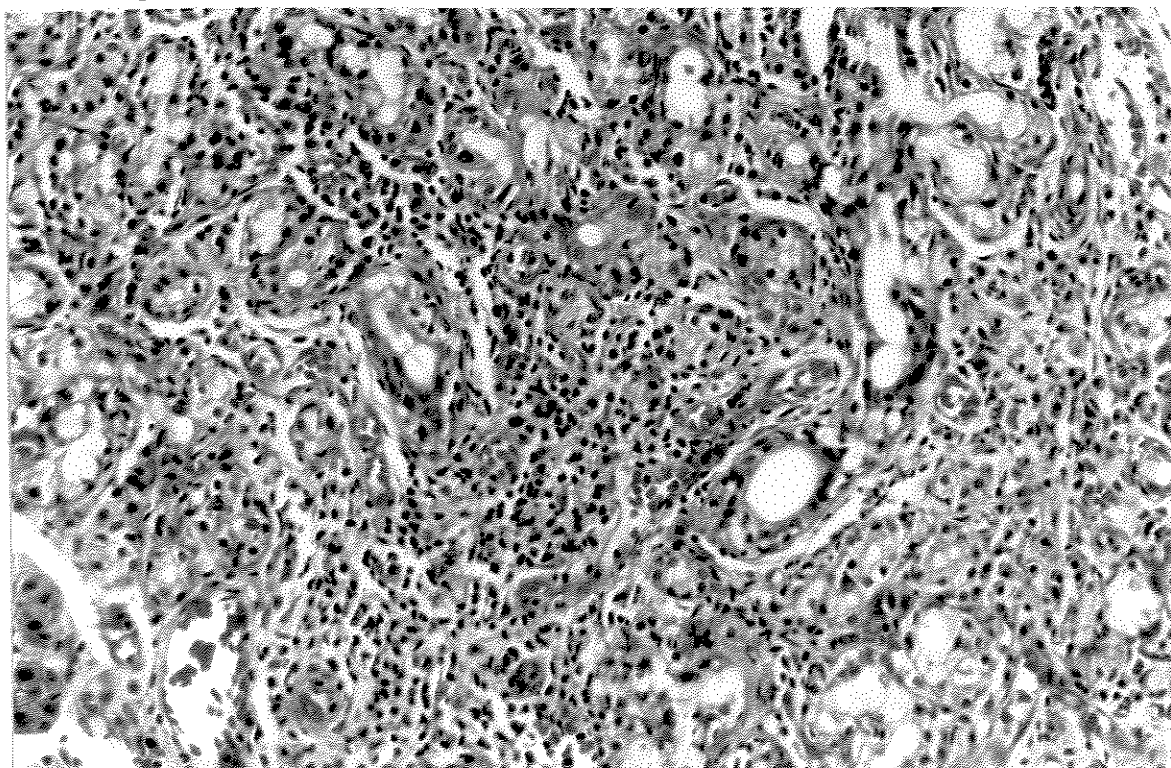


Figura 29 - Corte histológico de glândulas salivares menores com alterações morfológicas de GVHDc grau III, mostrando intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com destruição acinar moderada (H&E - 200X).

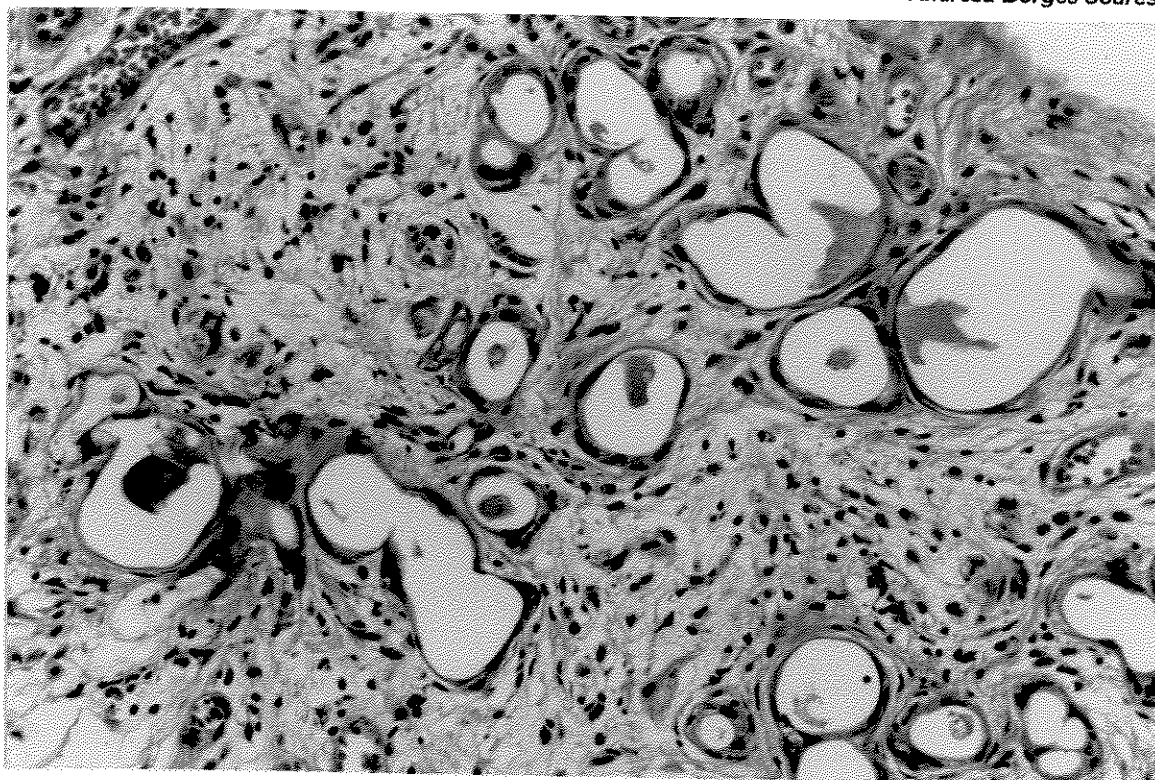


Figura 30 - Corte histológico de glândulas salivares com alterações morfológicas de GVHDc grau IV, mostrando escasso infiltrado linfoplasmocitário, perda acentuada de ácinos, dilatação ductal e intensa fibrose (H&E -200X)

3 – Resultados Imunoistoquímico

6.3.1 – Expressão dos marcadores em mucosa oral

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na expressão dos seguintes marcadores: CD45, CD8 e CD20 (Tabela 27).

Em relação ao marcador CD68, foi observada positividade em nove casos (64%) no grupo-controle e em 21 casos (96%) no grupo-experimental, com diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 27).

Quanto ao marcador CD4, foi observada positividade em seis casos (43%) no grupo-controle e em 18 casos (82%) no grupo-experimental, com diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 27).

6.3.2 – Expressão dos marcadores em glândulas salivares

Na amostras de glândulas salivares menores, a expressão dos marcadores CD68, CD45, CD4, CD8 e CD20 mostrou diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos (Tabela 28).

Os marcadores CD68 e CD45 apresentaram um padrão de marcação semelhante: em ambos os casos foram observados 10 casos (63%) de positividade no grupo-controle e 25 casos (100%) no grupo-experimental. Esse achado foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) (Tabela 28).

Para o marcador CD4, no grupo-controle, foi observada positividade em sete casos (44%) e , no grupo-experimental, em 25 casos (100%), havendo uma diferença estatisticamente significativa em ambos ($p < 0,001$) (Tabela 28).

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo-controle e o grupo-experimental para a positividade de CD8 ($p < 0,001$), pois no grupo-controle seis casos (38%) apresentaram positividade e, no grupo-experimental, todos os 25 casos (100%) foram positivos (Tabela 28).

Em relação à expressão para CD20, foi observado que 16 casos (100%) do grupo-controle mostraram-se negativos, enquanto que, no grupo-experimental, 14 casos (56%) foram negativos para a expressão de CD20, havendo uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,01$) (Tabela 28).

Tabela 27 – Expressão dos marcadores imunoistoquímicos na mucosa oral.

Marcadores		Grupo-controle n (%)		Grupo-experimental n (%)
CD68	Positivo	9 (64%)	Positivo	21 (96%)*
	Negativo	5 (36%)	Negativo	1 (4%)*
CD45	Positivo	11 (79%)	Positivo	20 (91%)
	Negativo	3 (21%)	Negativo	2 (9%)
CD4	Positivo	6 (43%)	Positivo	18 (82%)*
	Negativo	8 (57%)	Negativo	4 (18%)*
CD8	Positivo	9 (64%)	Positivo	19 (86%)
	Negativo	5 (35%)	Negativo	3 (14%)
CD20	Positivo	0	Positivo	1 (4%)
	Negativo	14 (100%)	Negativo	21 (96%)

Comparação pelo teste do qui-quadrado, * $p < 0,05$

Tabela 28 – Expressão dos marcadores imunoistoquímicos em glândulas salivares.

Marcadores	Grupo-controle n (%)		Grupo-experimental n (%)	
CD68	Positivo	10 (63%)	Positivo	25 (100%)*
	Negativo	6 (37%)	Negativo	0*
CD45	Positivo	10 (63%)	Positivo	25 (100%)*
	Negativo	6 (37%)	Negativo	0*
CD4	Positivo	7 (44%)	Positivo	25 (100%)*
	Negativo	9 (56%)	Negativo	0*
CD8	Positivo	6 (37%)	Positivo	25 (100%)*
	Negativo	10 (63%)	Negativo	0*
CD20	Positivo	0	Positivo	11 (44%)**
	Negativo	16 (100%)	Negativo	14 (56%)**

Comparação pelo teste do qui-quadrado, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

6.3.3 – Comparação da quantificação dos marcadores no epitélio entre os grupos

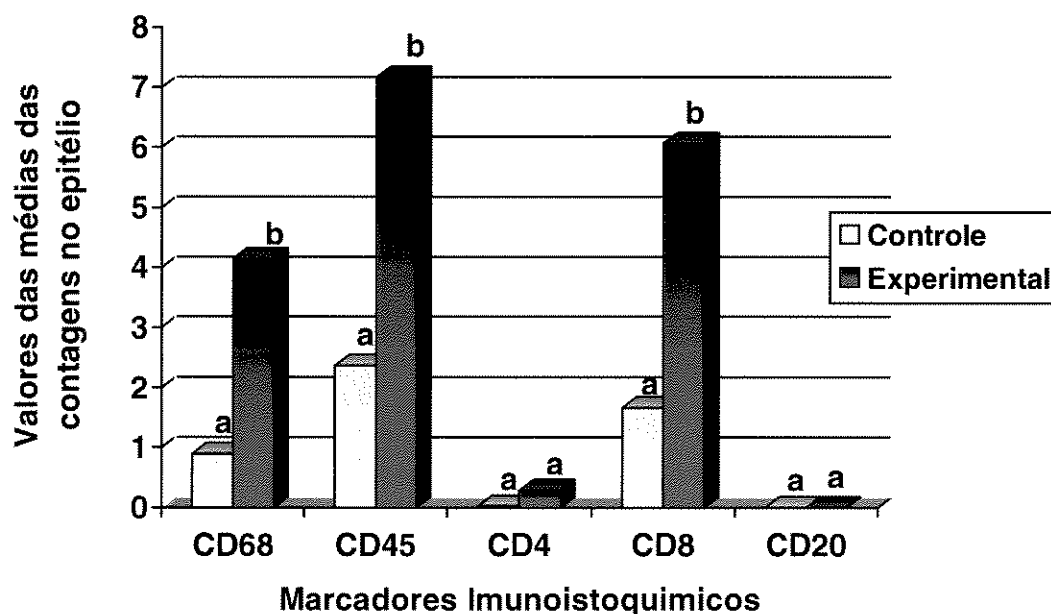
Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre a quantidade de células imuno-marcadas para os anticorpos CD68, CD45 e CD8 no epitélio, sendo que a maioria das células se encontrava no grupo-experimental (Tabela 29 e Figura 31).

Para os marcadores CD4 e CD20 não foram observadas diferenças estatísticas no número de células imuno-marcadas (Tabela 29 e Figura 31).

Tabela 29 - Valores das medias das contagens nos grupos controle e experimental para os marcadores CD68, CD45, CD4, CD8 e CD20, no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares.

Marcadores	Localização	Contagem das Células	
		Controle	Experimental
Cd68			
	Epitélio	0,90 (1,31) a	4,15 (3,28)**b
	Conjuntivo	5,09 (4,98) a	13,79 (6,69)**b
	Glândula	4,06 (4,50) a	16,98 (9,80)*b
CD45			
	Epitélio	2,37 (2,83) a	7,17 (5,97)**b
	Conjuntivo	5,36 (4,44) a	24,3 (10,43)**b
	Glândula	3,27 (3,70) a	24,79 (16,23)*b
CD4			
	Epitélio	0,03 (0,11) a	0,29 (0,78) a
	Conjuntivo	1,05 (2,19) a	5,33 (5,72)***b
	Glândula	0,57 (0,80) a	5,68 (4,91)*b
CD8			
	Epitélio	1,67 (1,88) a	6,07 (5,59)**b
	Conjuntivo	2,36 (2,77) a	15,7 (12,7)** b
	Glândula	0,31 (0,48) a	11,13 (10,36)*b
CD20			
	Epitélio	0,00	0,00
	Conjuntivo	0,00 a	0,10 (0,3) a
	Glândula	0,00 a	0,90 (2,4) a

Valores médios seguidos por letras minúsculas diferentes, em linha, diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student para amostras independentes (*p< 0,001; ** p< 0,01; *** p< 0,05).

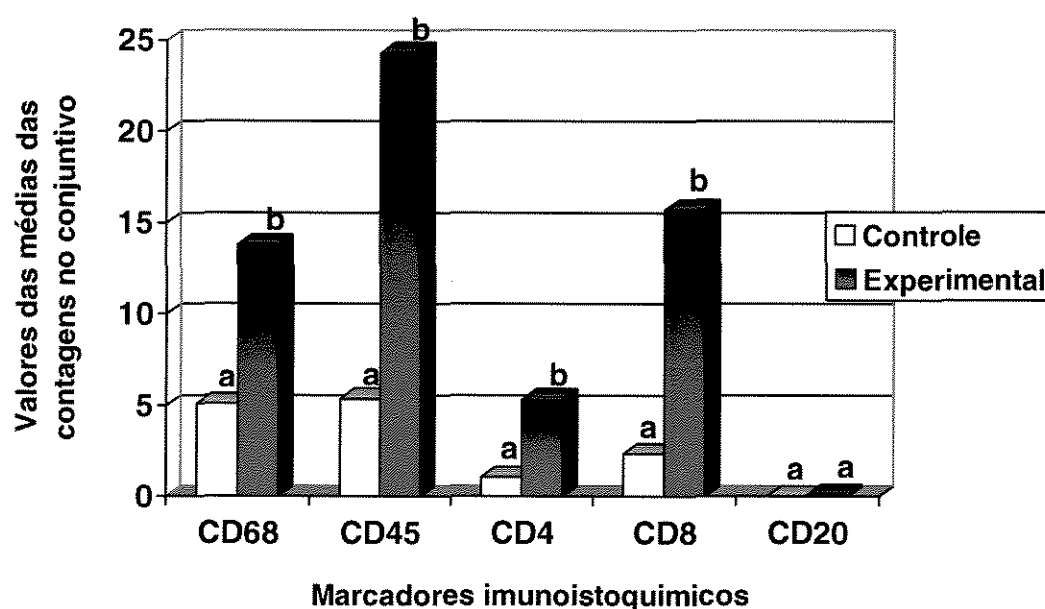


Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t Student para amostras independentes ($p < 0,05$)

Figura 31 - Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células imuno-marcadas no tecido epitelial.

6.3.4 – Comparação da quantificação dos marcadores no conjuntivo entre os grupos

Na avaliação da quantidade de células positivas no tecido conjuntivo, o resultado foi similar ao observado no epitélio, com exceção do CD4 que mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo-experimental e o grupo-controle (Tabela 29 e Figura 32).



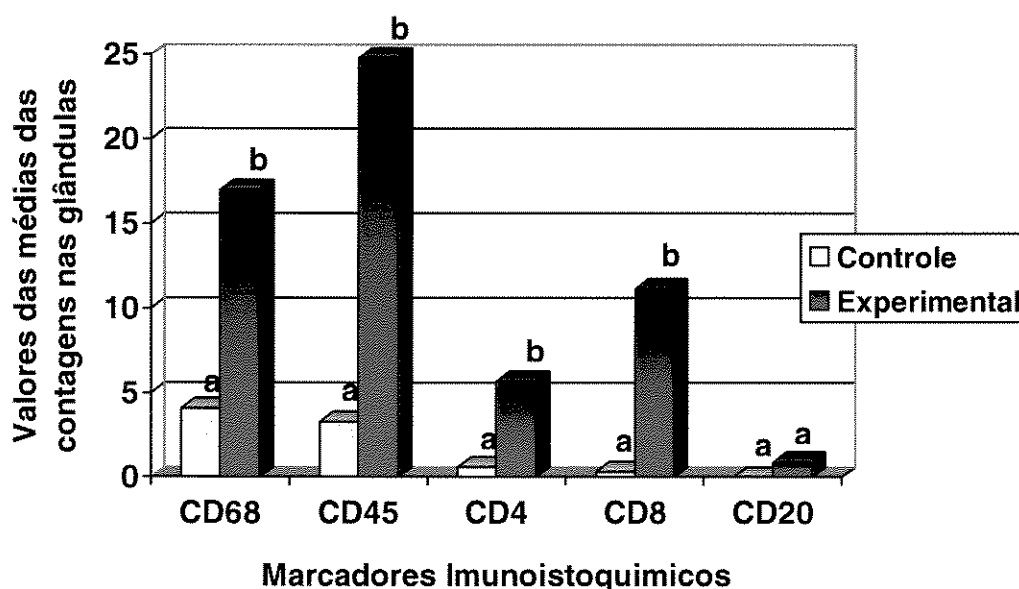
Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t Student para amostras independentes ($p < 0,05$)

Figura 32 - Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células positivas no tecido conjuntivo.

6.3.5 – Comparação da quantificação dos marcadores em glândulas salivares entre os grupos

Numa análise quantitativa de células positivas nas glândulas salivares, nos dois grupos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para os seguintes marcadores: CD68, CD45, CD4 e CD8, sendo que, em todos os marcadores foi observado um maior número de células nas glândulas do grupo-experimental (Tabela 29 e Figura 33).

O marcador CD20 não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas glândulas entre os grupos estudados (Tabela 29 e Figura 33).



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t Student para amostras independentes ($p < 0,05$)

Figura 33 - Ilustração gráfica dos valores médios de contagem das células imuno-marcadas nas glândulas salivares.

6.3.6 – Comparação da quantificação dos marcadores entre o epitélio e o conjuntivo

Foi realizada, no grupo-experimental, uma comparação quanto ao número de células positivas no tecido epitelial e no tecido conjuntivo para cada um dos marcadores estudados. Observou-se que para os marcadores CD68, CD45, CD4 e CD8 houve um maior número de células marcadas no tecido conjuntivo. Essa maior expressão foi estatisticamente significante ($p < 0,001$) (Tabela 29 e Figura 34). Não se observou importância significante quando comparado o número de células expressadas no tecido epitelial e no tecido conjuntivo para o marcador CD20 (Tabela 29 e Figura 34).

6.3.7 – Comparação da quantificação dos marcadores entre o tecido conjuntivo e glândulas salivares

Na comparação da quantidade de células marcadas entre o tecido conjuntivo subepitelial da mucosa e as glândulas salivares do grupo-experimental, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas para os marcadores CD8 e CD20, havendo um predomínio das células no tecido conjuntivo (Tabela 29 e Figura 34).

Para os marcadores CD68, CD45 e CD4, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células no tecido conjuntivo e nas glândulas salivares (Tabela 29 e Figura 34).

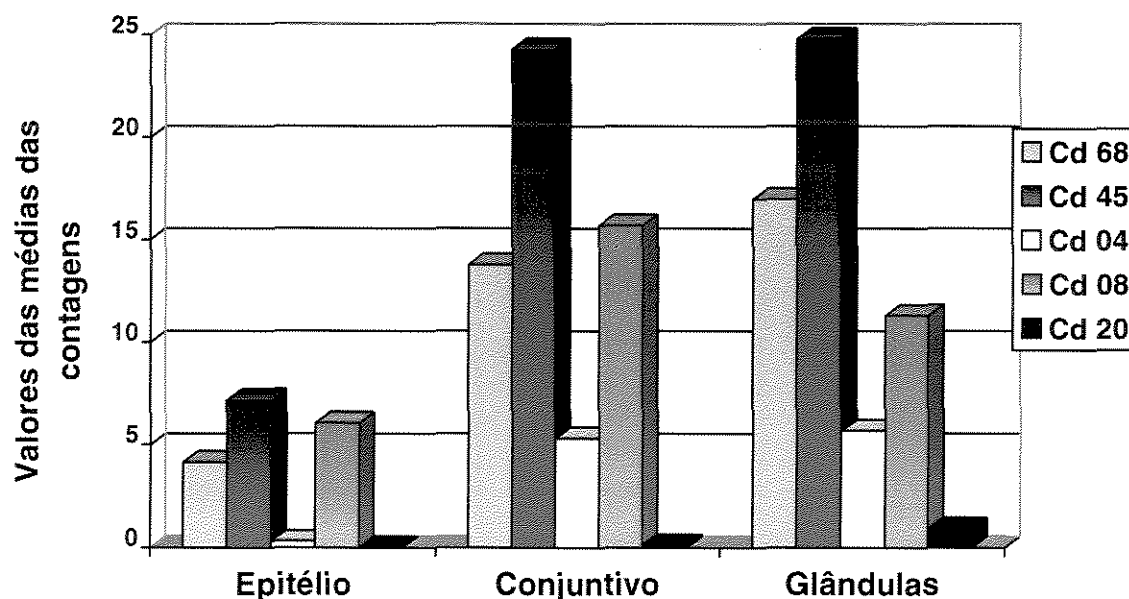
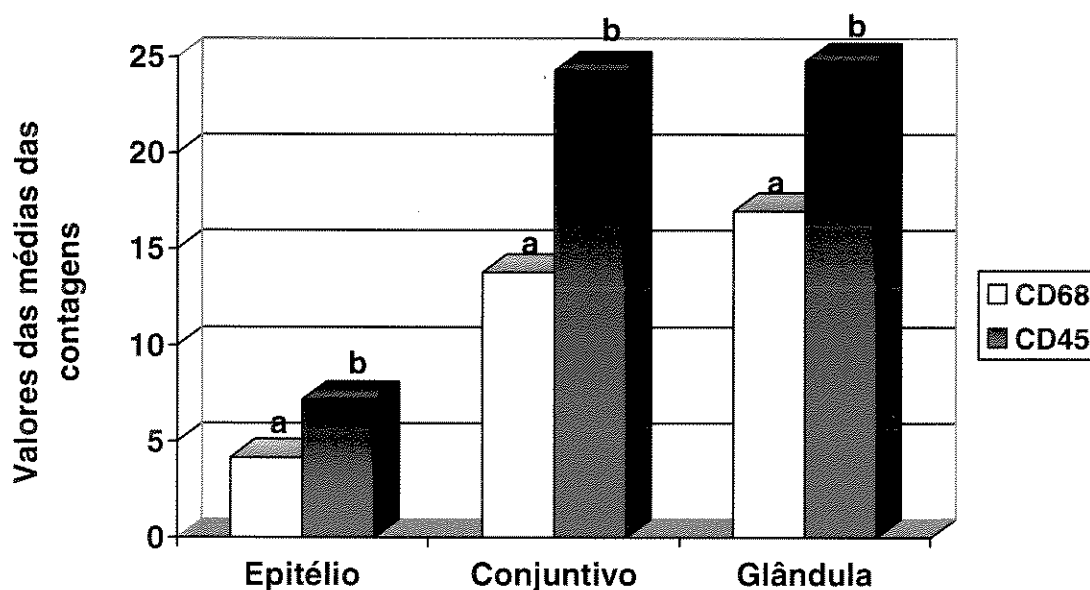


Figura 34 – Colunas dos valores médios de contagem das células positivas no tecido epitelial, conjuntivo e nas glândulas salivares no grupo-experimental.

6.3.8 – Comparação da quantificação de CD68 e CD45

Foi comparada no grupo-experimental a quantidade de células positivas para os marcadores CD68 e CD45 no tecido epitelial, conjuntivo e nas glândulas salivares. Os resultados demonstraram valores estatisticamente significantes ($p < 0,01$) tanto no tecido epitelial, como no conjuntivo e nas glândulas salivares, havendo um predomínio das células CD45 (Tabela 29 e Figuras 35, 38, 39, 40 e 41).

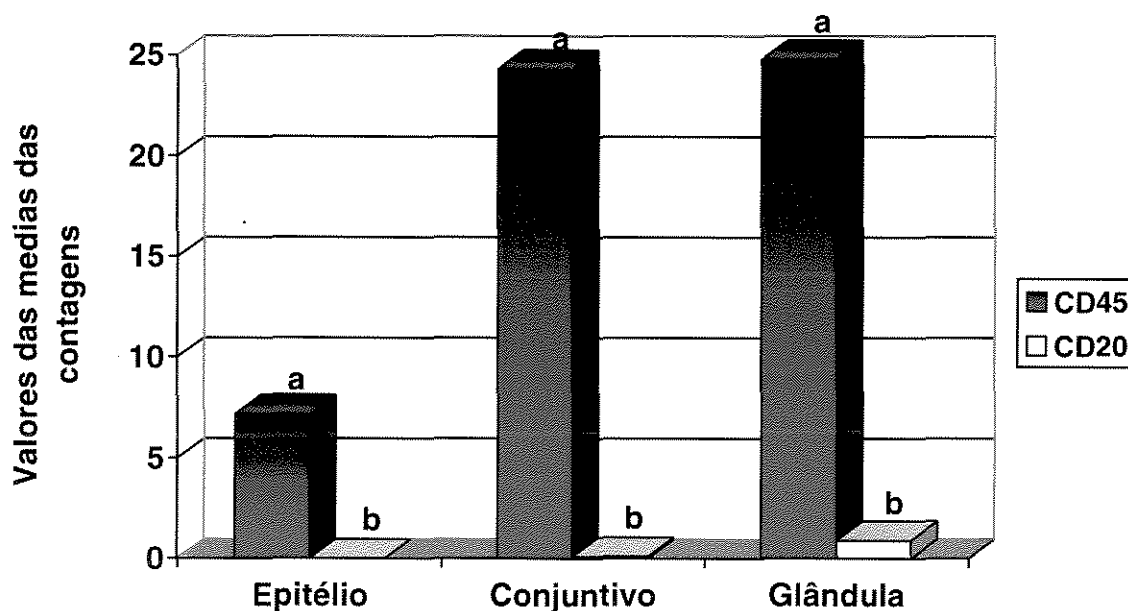


Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,01$).

Figura 35 – Valores das médias da contagem CD68 e CD45 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental.

6.3.9 – Comparação da quantificação de CD45 e CD20

Na comparação da quantidade de células marcadas com os anticorpos CD45 e CD20, no grupo-experimental, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares, sendo que em todos os casos houve um predomínio das células CD45 (Tabela 29 e Figura 36).

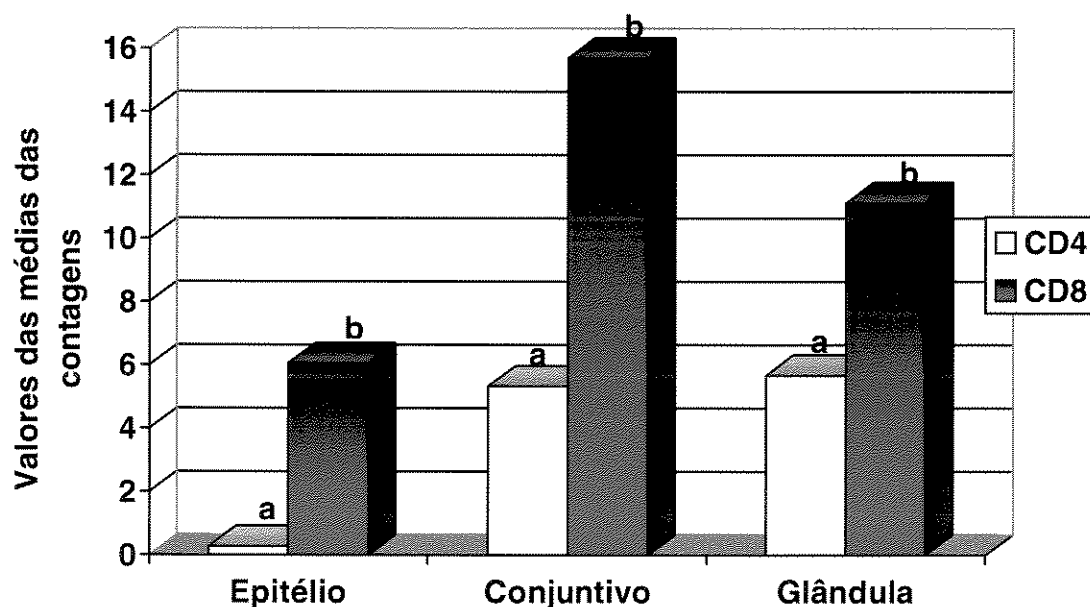


Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,001$).

Figura 36 – Valores das médias da contagem CD45 e CD20 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental.

6.3.10 – Comparação da quantificação de CD4 e CD8

Realizou-se a comparação entre a quantidade de células positivas para os marcadores CD4 e CD8, no epitélio, conjuntivo e glândula salivar do grupo-controle. Observou-se uma maior quantidade de células CD8 em todos os tipos de tecido, havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,001$) (Tabela 29 e Figuras 37, 40 e 41).



Barras com letras distintas diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student para amostras pareadas ($p < 0,001$).

Figura 37 – Valores das médias das contagens de CD4 e CD8 no tecido epitelial, conjuntivo e glândulas salivares no grupo-experimental.

6.3.11 – Correlação entre o grau histológico de GVHDc e os marcadores imunoistoquímicos no tecido epitelial

Houve uma correlação entre o grau de acometimento histológico da GVHDc e os seguintes marcadores no tecido epitelial, CD68, CD45 e CD8, ou seja, quanto maior o grau de acometimento da GVHDc no epitélio, maior o número de macrófagos e linfócitos T CD8.

6.3.12 – Correlação entre o grau histológico de GVHDc e os marcadores imunoistoquímicos no tecido conjuntivo

No tecido conjuntivo, observou-se uma correlação entre o grau de acometimento histológico da GVHDc com os marcadores CD68, CD45, CD4 e CD8, numa relação diretamente proporcional.

6.3.13 – Correlação entre o grau histológico de GVHDc e os marcadores imunoistoquímicos na glândula salivar

Não se observou nenhuma correlação entre o grau de acometimento histológico da GVHDc em glândulas salivares em quaisquer dos marcadores estudados.

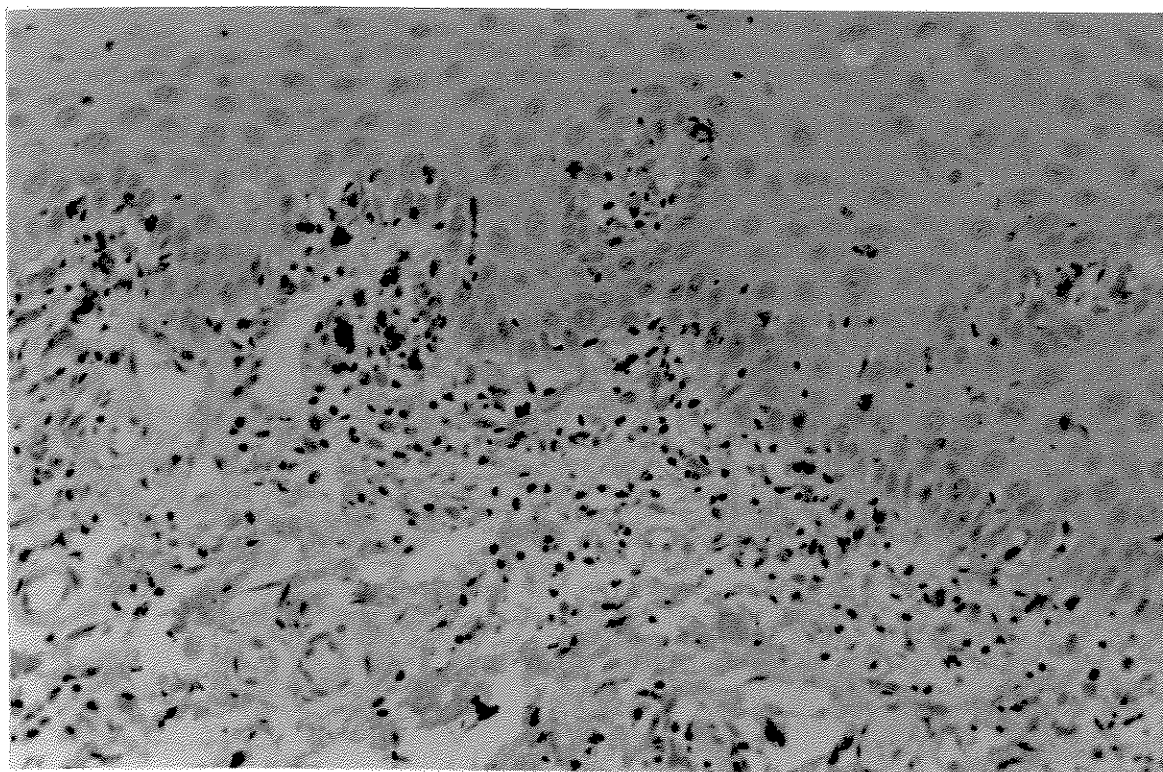


Figura 38 – Marcação imunoistoquímica para CD68, onde observamos a positividade de macrófagos na mucosa oral (200X)

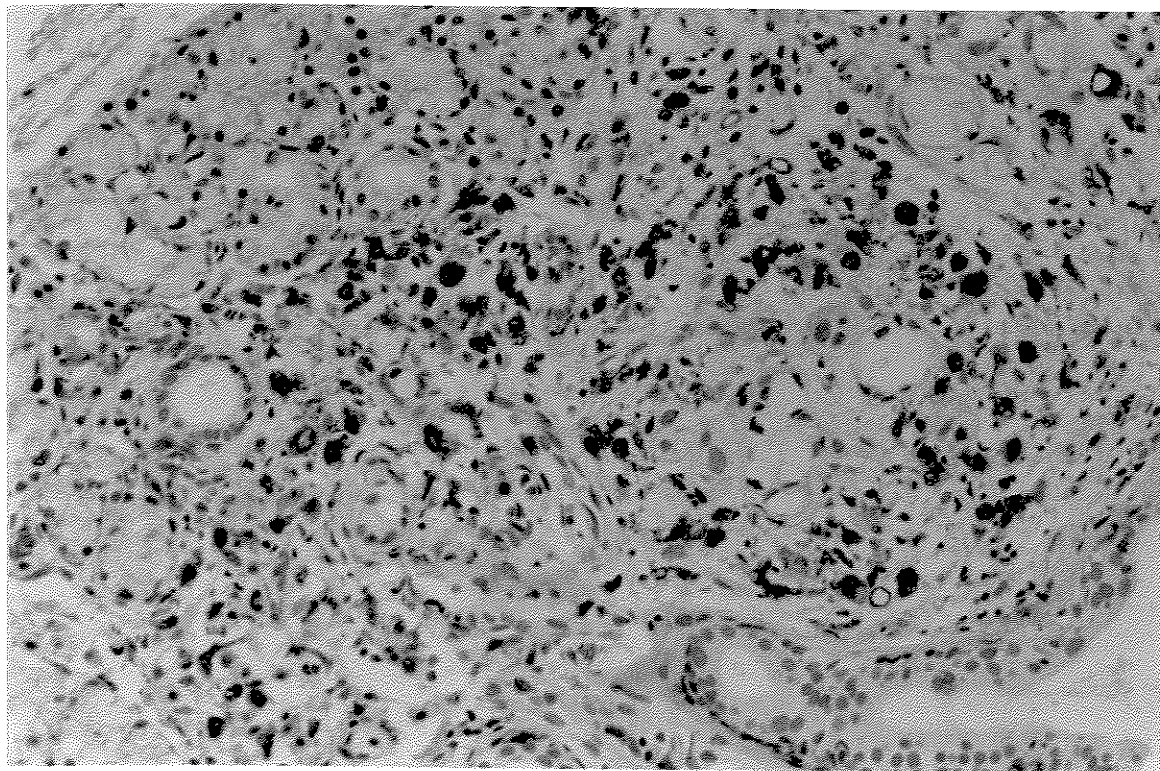


Figura 39 - Marcação imunoistoquímica para CD68, onde observamos a positividade de macrófagos nas glândulas salivares menores (200X).

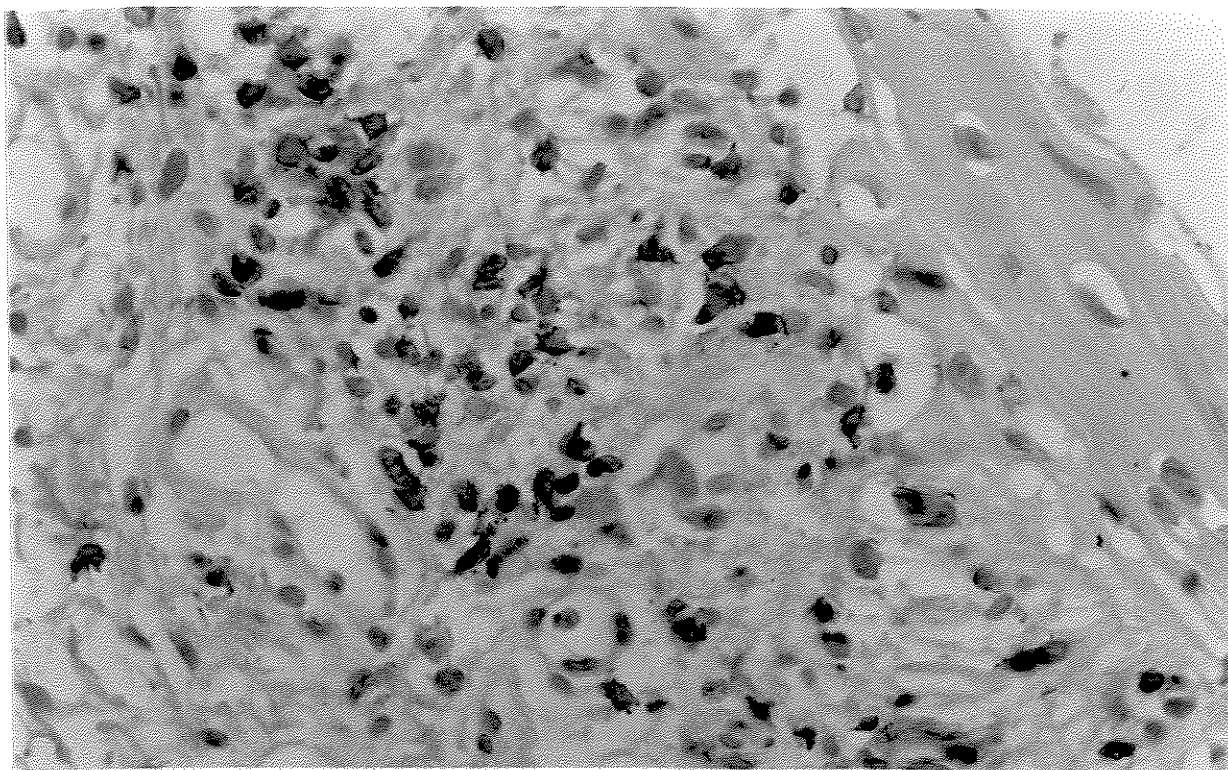


Figura 40 - Marcação imunoistoquímica para CD45, onde observamos a positividade de linfócitos na mucosa oral (400X).

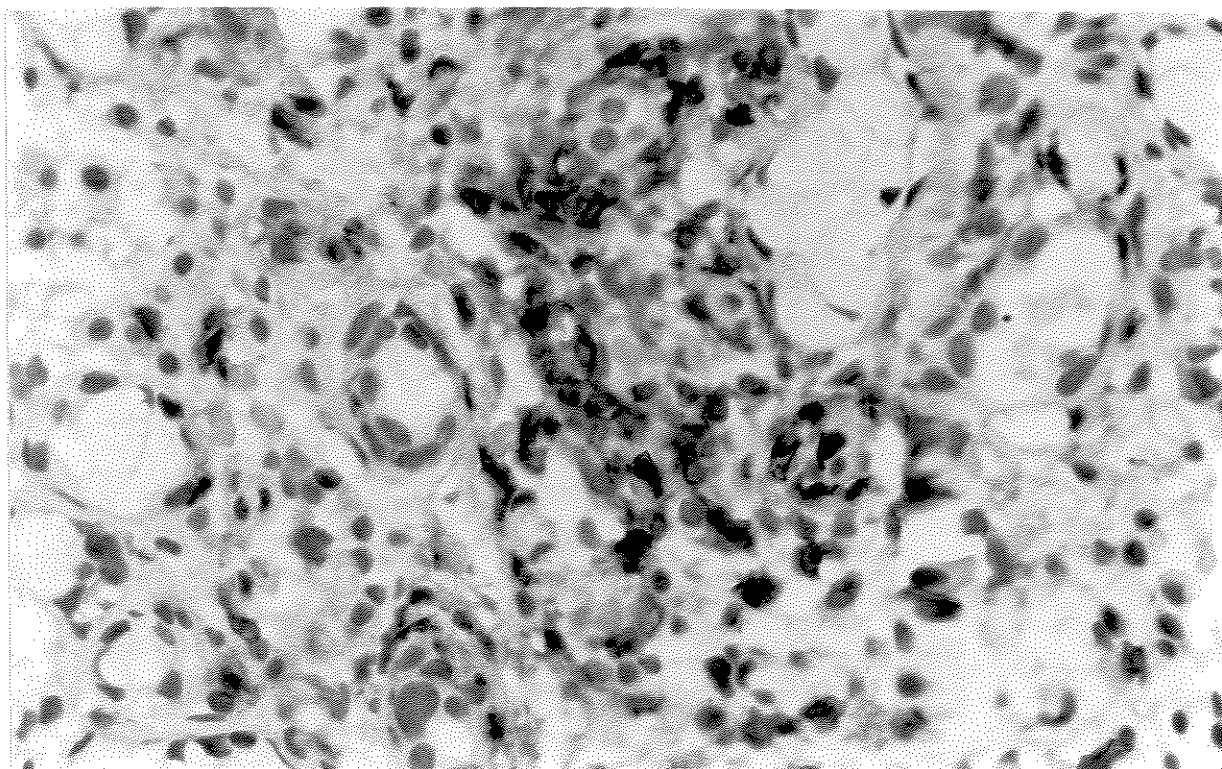


Figura 41 - Marcação imunoistoquímica para CD45, onde observamos a positividade de linfócitos nas glândulas salivares menores (400X).

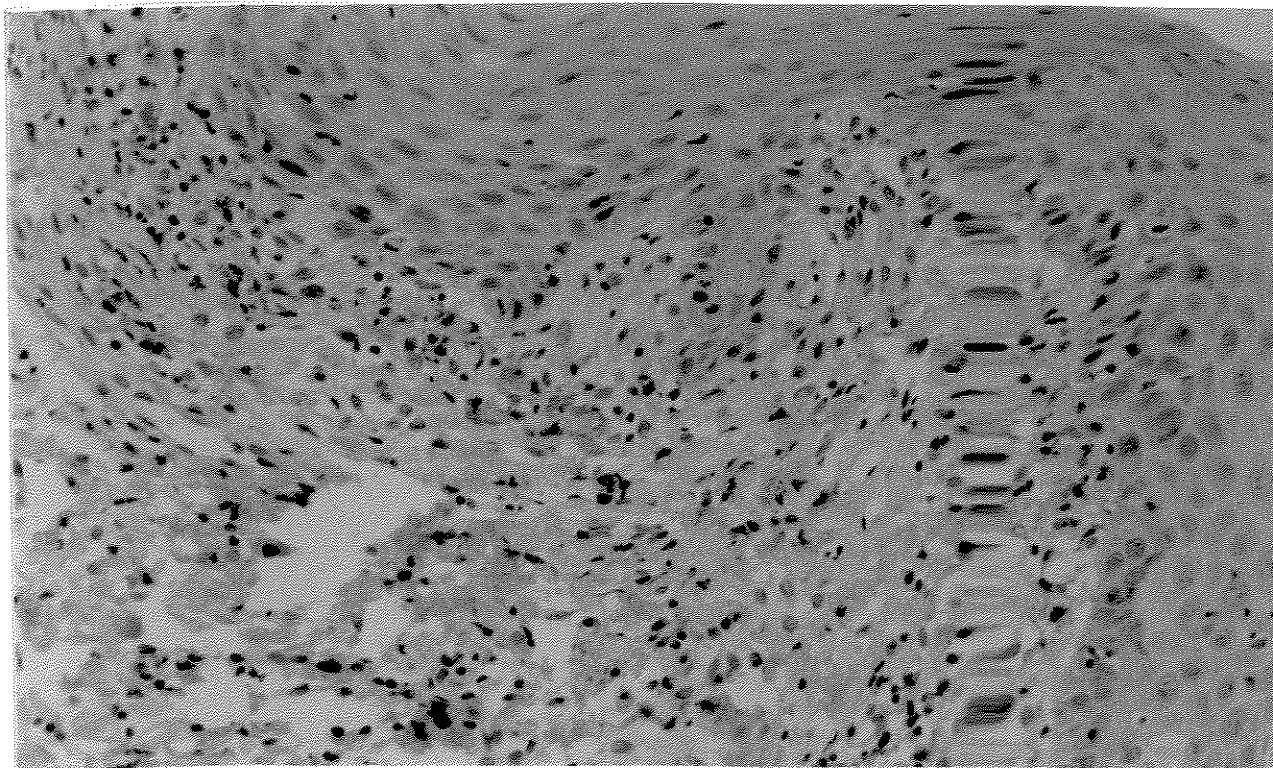


Figura 42 – Marcação imunoistoquímica para CD8, onde observamos a positividade de linfócitos citotóxicos na mucosa oral (200X).

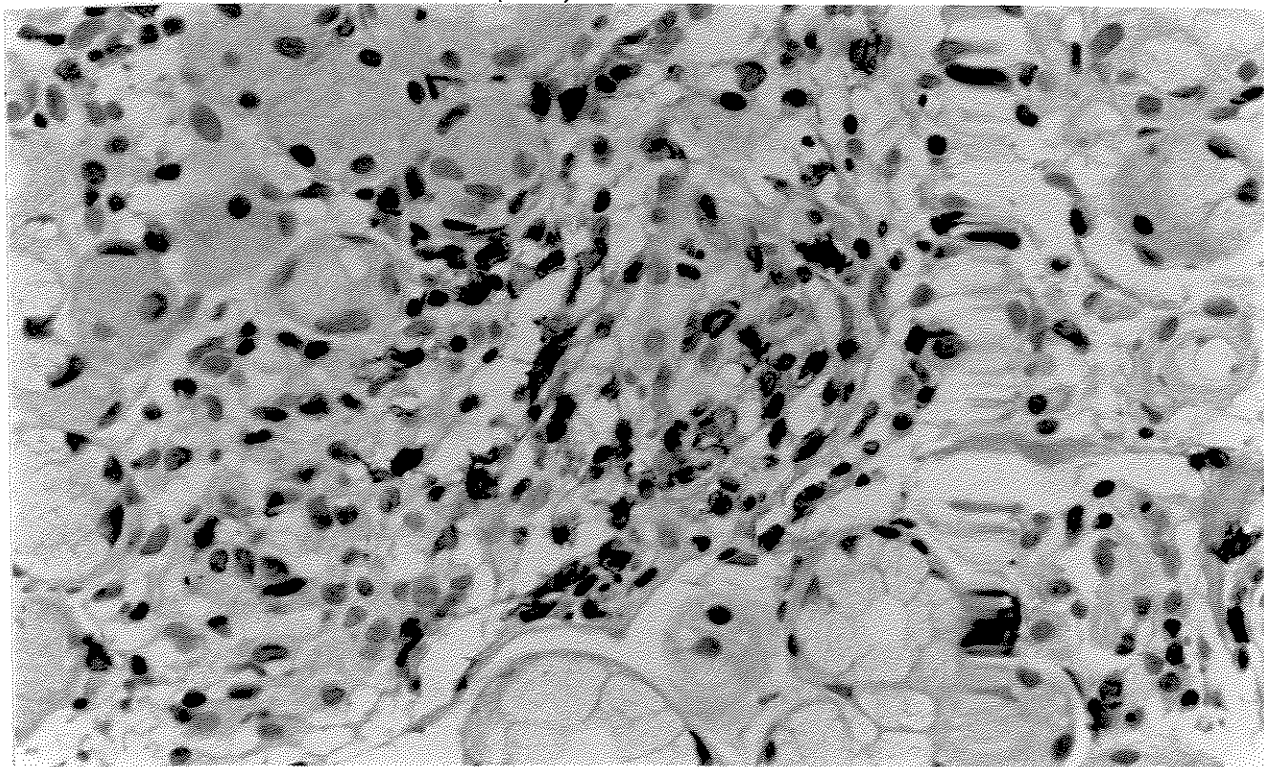


Figura 43 - Marcação imunoistoquímica para CD8, onde observamos a positividade de linfócitos citotóxicos nas glândulas salivares menores (400X).

7 – DISCUSSÃO

A GVHDc foi descrita pela primeira vez por Storb na década de 70, quando os pacientes tratados com o TMO, passaram a sobreviver tempo suficiente para a sua manifestação. Desde então, tem se mostrado como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos ao transplante alogênico de medula óssea.

A GVHDc ocorre devido à presença de células imunocompetentes na medula do doador que provavelmente reconhecem antígenos de histocompatibilidade menor do hospedeiro provocando uma resposta imune destrutiva (Eisner *et al.*, 1995). No entanto, como esse mecanismo é extremamente complexo e a etiopatogenia da doença ainda não é totalmente conhecida.

Em vista dessa complexidade e dos escassos conhecimentos sobre os mecanismos imunológicos associados à GVHDc, procuramos avaliar, comparativamente, os achados clínicos, histológicos e imunoistoquímicos em pacientes que realizaram TMO e que desenvolveram ou não GVHDc.

Vários estudos têm mostrado que as manifestações clínicas da GVHDc podem assemelhar-se a diversas doenças auto-imunes, como Síndrome de Sjögren, Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e Esclerodermia (Nakamura *et al.*, 1996). As manifestações clínicas podem refletir acometimento de qualquer órgão do corpo, mas os locais mais afetados são pele, boca, fígado, olhos, esôfago e trato respiratório superior (Jacobsohn *et al.*, 2001). De fato, neste

estudo, em que todos os pacientes selecionados desenvolveram lesão em cavidade oral, a maioria apresentava comprometimento simultâneo de outros órgãos, como fígado, pele, olho, TGI, pulmão e rim.

A literatura relata como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de GVHDc o sexo do doador, ou seja, receptores do sexo masculino que recebem medulas de doadores do sexo feminino têm maior chance de desenvolver GVHDc. Uma explicação para este fato é que antígenos masculinos são reconhecidos e atacados mais facilmente pelas células do sistema imune da doadora. Outra explicação seria a de que, doadoras femininas poderem ter sido sensibilizadas durante gravidez anterior ao transplante (Zecca *et al.*, 2002; Gaziev *et al.*, 2000; Eisner *et al.*, 1995; Vogelsang *et al.*, 1990). No entanto, essas são apenas hipóteses que procuram explicar os fatores associados a maior frequência de GVHDc nestes casos. Contudo, em nosso estudo, os resultados não mostraram nenhuma relação estatística entre o sexo do doador e a frequência da doença.

A idade do paciente tem sido relatada como outro fator de risco para GVHDc, sendo que quanto mais velho o paciente maior a chance de desenvolver GVHDc (Zecca *et al.*, 2002; Eisner *et al.*, 1995). Zecca *et al.* (2002), relataram que crianças menores de 5 anos de idade têm chance de 14% menos de desenvolver GVHDc, enquanto que, em pacientes entre 5 e 15 anos e maiores de 15 anos de idade, a probabilidade sobe para 30% e 44%, respectivamente. Neste estudo, houve diferença estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes do grupo-controle e grupo-experimental estudados, sendo que, no grupo controle os pacientes apresentaram uma idade média menor do que no grupo de pacientes

que desenvolveram GVHDc, concordando dessa maneira com os achados da literatura.

A presença prévia de GVHDa tem sido descrita como sendo um dos maiores fatores de risco para a GVHDc (Zecca *et al.*, 2002; Gaziev *et al.*, 2000; Eisner *et al.*, 1995; Vogelsang *et al.*, 1990). Em nosso estudo, dos 25 pacientes que desenvolveram GVHDc, apenas três (12%) manifestaram GVHDa, o que não mostrou significância estatística.

Vigorito *et al.* (1998), descreveram a possibilidade de maior desenvolvimento da doença em pacientes que receberam enxertos de medula por CTP. O tipo de coleta de células foi também um fator preditivo para o aparecimento de GVHDc em nosso estudo, pois, nos pacientes que recebem o transplante através de CTP observou-se um maior índice de GVHDc, apesar do número desigual de pacientes que receberam o transplante em tipo de coleta.

Infecções virais, principalmente da família do Herpes Vírus, têm sido relatadas como tendo um papel importante na iniciação e/ou exacerbação da GVHDc (Woo *et al.* 1997; Curtis & Caughman *et al.* 1994; Boström *et al.* 1988). Em vários estudos clínicos, doadores e receptores para transplante que possuem soropositividade para múltiplas herpesvíroses, apresentam os maiores índices de associação com a GVHDa e GVHDc no receptor (Curtis & Caughman *et al.* 1994; Boström *et al.* 1988). Nossos resultados encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre os 23 pacientes do grupo-experimental contra oito pacientes do grupo controle que desenvolveram infecção viral.

O principal fator relacionado à morbidade e mortalidade, nos pacientes com GVHDc, tem sido o comprometimento orgânico por infecções secundárias. Dentre os vários tipos de infecções já relatadas nesses pacientes, as infecções virais são uma das mais prevalentes, dentre elas, as mais comuns são: Citomegalovírus, Herpes Vírus Simples, Varicela Zoster Virus e Epstein-Barr Vírus. Contudo, a maior causa de morbidade e mortalidade, bem como de frequência de aparecimento é a infecção por Citomegalovirus (Schubert *et al.* 1993). Meyers (1986), relatou que 60% dos pacientes que receberam TMO e desenvolveram GVHDc, manifestaram infecção sistêmica por CMV, enquanto que dentre os pacientes que não foram acometidos por GVHDc, apenas 42% desenvolveram infecção por CMV. Em nosso estudo, o tipo de infecção viral não foi um fator estatisticamente significativo para o aparecimento de GVHDc. Em relação às infecções encontradas em nossos pacientes, observou-se maior comprometimento por CMV nos pacientes do grupo-experimental. Destes, 56% manifestaram infecção por CMV, 36% por HSV, 24% por VZV e 4% por HPV, enquanto que, no grupo controle, encontrou-se frequência de 25% por CMV, 19% por HSV e 19% por VZV.

O tempo médio para o diagnóstico da GVHDc é bastante variado na literatura. A maioria dos trabalhos relata que o diagnóstico da doença é estabelecido numa média superior a 100 dias pós-transplante. Hasséus *et al* (2001), descreveu uma média de 231 dias, enquanto que Nakamura *et al* (1996) relatou uma média de 144 dias. No entanto, apenas Galitis *et al* (2001), relatou a média do dia do diagnóstico do aparecimento da doença na cavidade oral, que era

de 172 dias. Em nosso estudo, a média foi de 262 dias pós-transplante, um número maior do que o relatado por Galitis *et al.* (2001). Nós acreditamos que essa diferença possa depender do tamanho da amostra, pois no estudo de Galitis *et al.* (2001) foram estudados apenas 11 pacientes, enquanto que, em nosso estudo, a amostragem foi de 25 pacientes.

A sobrevida dos pacientes pós-TMO está correlacionada, basicamente, à doença de base, seu estágio no momento do transplante e ao regime de condicionamento e profilaxia para GVHD (Reiter *et al.*, 1997). Nos 41 pacientes por nós estudados, houve apenas quatro óbitos, sendo que, em dois pacientes, a causa de morte foi relacionada à GVHDc extensa e, nos outros dois pacientes a causa de morte foi devida à septicemia. É importante ressaltar que os quatros casos de óbitos ocorreram no grupo experimental (estatisticamente significativa), o que pode indicar que os pacientes que desenvolvem GVHDc são mais susceptíveis às suas complicações, como infecções, por exemplo.

As manifestações clínicas da GVHDc são bastante variadas (Woo *et al.*, 1997). Destas, eritema e atrofia da mucosa, lesões liquenóides, perda do paladar e xerostomia são as principais manifestações na cavidade oral (Woo *et al.*, 1997). Muitas dessas lesões da cavidade oral podem anteceder o envolvimento da doença em outros órgãos (Nakamura *et al.*, 1996). Por isso, um correto diagnóstico histopatológico dessas lesões pode auxiliar, tanto na evolução da doença, como no seu prognóstico.

Os critérios utilizados para graduar, histologicamente, a GVHDc, no nosso trabalho, baseou-se na classificação de Horn *et al.* (1995). Em mucosa oral, as

alterações histopatológicas mais comuns são: vacuolização da camada basal, presença de corpos apoptóticos, infiltrado inflamatório linfocitário e clivagem entre o tecido epitelial e o conjuntivo (Horn *et al.*, 1995; Woo *et al.*, 1997). Em nosso estudo, esses achados em mucosa oral foram mais evidentes no grupo-experimental do que no grupo-controle, mostrando portanto, que o exame histológico é um meio fidedigno de avaliar as alterações observadas na clínica.

A vacuolização do epitélio é um importante critério para o diagnóstico da GVHDc (Horn *et al.*, 1995; Woo *et al.*, 1997). Contudo, Nakamura *et al.* (1996) verificaram a vacuolização epitelial em apenas 4 dos 11 casos de GVHDc avaliados. Nos 25 pacientes com GVHDc por nós estudados, foi observada a presença de vacuolização epitelial em 16 pacientes (73%) sendo, portanto, a vacuolização das células epiteliais um componente importante da GVHDc.

Outro achado importante a ser ressaltado é a densidade do infiltrado inflamatório associado à GVHDc. A literatura descreve que a intensidade do infiltrado inflamatório na mucosa oral de pacientes com GVHDc é considerada de baixa intensidade e possivelmente decorrente do uso das drogas imunossupressoras utilizadas no protocolo terapêutico do TMO (Woo *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1996). Contrário a isso, em nosso estudo, foi observado que a frequência de infiltrado inflamatório foi de 91% nos pacientes do grupo-experimental, sendo a maioria classificado como moderado(50%), enquanto que, no grupo-controle, esse mesmo infiltrado estava presente em 50% e a maioria era classificado como leve (43%). Essa diferença foi estatisticamente significativa. Apesar dos nossos achados contrastarem com os da literatura, o infiltrado

inflamatório na mucosa oral, quando moderado ou intenso, sinaliza para o diagnóstico histológico de GVHDc.

As glândulas salivares menores têm sido atualmente valorizadas no diagnóstico de GVHDc, pois os achados histopatológicos refletem bem o *status* da GVHDc, além de serem, as biópsias facilmente obtidas, sem oferecer riscos maiores às condições sistêmicas, já precárias destes pacientes (Hiroki *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1996).

Segundo Horn *et al.* (1995) e Woo *et al.* (1997), as principais alterações histopatológicas encontradas nas glândulas salivares são: presença de infiltrado inflamatório difuso, diminuição do número de ductos e ácinos, dilatação ductal e fibrose intersticial. Nakamura *et al.* (1996), relatou que algumas das alterações das glândulas salivares, como destruição de ácinos e atrofia leve, podem ser correlacionadas com o uso de drogas anteriormente ao transplante. Em nosso estudo, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à diminuição do número de ductos e ácinos, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial, mostrando que estes achados podem ser considerados como característicos da GVHDc, e não meramente uma consequência do condicionamento prévio do paciente. Por outro lado, é importante ressaltar que, dentro do grupo-controle, foram encontrados dois casos com alterações histológicas compatíveis com GVHDc grau II. Isso pode representar tanto um quadro de GVHDc subclínico quanto um resultado falso-positivo, ou seja, uma sialoadenite de outra natureza, provavelmente vinculada ao uso de drogas como a infecções oportunistas viróticas.

No que diz respeito ao estudo comparativo dos achados histopatológicos de GVHDc em mucosa e glândulas salivares menores, para estabelecer um diagnóstico mais fidedigno da doença, os achados na literatura são bastante contraditórios (Nakleh *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1996). Nakleh *et al.* (1989), desenvolveu um estudo do valor do diagnóstico baseado na mucosa oral, comparativamente às glândulas salivares menores, para a GVHDc. O autor observou que 20% dos resultados em mucosa oral eram falso-negativos, enquanto que, na glândula salivar menor, somente 11% eram falso-negativos. Em vista disso, o autor concluiu que ambos os tecidos devem ser incluídos na biópsia para um diagnóstico mais preciso. Todavia, Nakamura *et al.* (1996), relatou que o infiltrado inflamatório é mais freqüentemente observado em glândulas salivares do que em mucosa oral, sugerindo que a biópsia de glândulas salivar é mais precisa para o diagnóstico de GVHDc. Em nosso estudo, embora o critério para seleção dos pacientes no grupo experimental tenha sido a presença de GVHDc em glândulas salivares, nós encontramos alterações compatíveis com GVHDc em mucosa oral em 77% dos casos. Portanto, nós acreditamos que tanto a mucosa oral quanto as glândulas salivares devem ser analisadas para o diagnóstico de GVHDc, com o intuito de minimizar o número de resultados falso-negativos.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na GVHDc são bastante complexos e pouco conhecidos. Na literatura, há poucos relatos de estudos imunoistoquímicos em mucosa oral e glândulas salivares, sendo, a maioria destes trabalhos baseados num número inferior a 16 pacientes (Hasséus *et al.*, 2001;

Fujiwara et al., 1996; Nakamura et al., 1994). Nossa amostra foi superior aos relatos da literatura inglesa, com um total de 25 casos.

Os linfócitos T são considerados como as principais células envolvidas na patogenia da doença, sendo os maiores responsáveis pelos danos teciduais. Vários estudos tentam caracterizar o tipo de linfócito encontrado nas lesões, mas os resultados são bastante variados (Mattsson *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1996; Hasséus *et al.*, 2001). Nakamura *et al.* (1996), encontrou um leve predomínio de linfócitos T CD08 em GVHDc na mucosa oral. Ao contrário, Mattsson *et al.* (1992) e Hasséus *et al.* (2001), relataram um predomínio de linfócitos T CD4. Nossos resultados mostraram haver um predomínio de linfócitos T CD8, tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo da mucosa oral.

Nas glândulas salivares, os achados foram semelhantes aos da mucosa oral, havendo também um predomínio de linfócitos CD8. Nakamura *et al.* (1994), num estudo comparativo entre GVHDc e Síndrome de Sjögren, observou que nas glândulas salivares dos pacientes com GVHDc, houve um predomínio de CD8, enquanto que na Síndrome de Sjögren houve o predomínio de CD4.

Além dos linfócitos, uma série de outras células participam da patogenia da GVHDc, contribuindo com o início e manutenção das lesões. Entre essas células, ditas como auxiliares, encontram-se os macrófagos. Mattsson *et al.* (1992), ao estudarem a presença de macrófagos em líquen plano e GVHDc, observaram que menos de 1% do componente do infiltrado inflamatório em ambas as lesões correspondia a essas células. Em nosso estudo, os macrófagos (CD68+) foram

observados tanto no componente epitelial quanto no tecido conjuntivo e glândulas salivares, mas em quantidade bem menor do que os linfócitos (CD 45+).

Nós também avaliamos a expressão de macrófagos (CD 68+), linfócitos T (CD 45+), linfócitos B (CD 20+) e CD 4 e CD 8 em pacientes que realizaram TMO mas não desenvolveram GVHDc. No entanto, o número de células expressadas para cada marcador foram insignificante.

Em resumo, os aspectos imunoistoquímicos dos pacientes com GVHDc mostraram que as principais células envolvidas no infiltrado inflamatório foram os linfócitos T CD8, tanto no tecido epitelial, quanto no conjuntivo e glândulas salivares. Macrófagos e linfócitos T CD4 também estavam presentes, porém em menor quantidade, mostrando que estas células também podem estar participando do mecanismo patogênico da doença, porém, com menor importância.

8 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos do estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico e morfométrico pode-se concluir que:

1 – Idade avançada do paciente, transplante por CTP e presença de infecções demonstraram ser fatores de risco para GVHDc.

2 – Vacuolização da camada basal, infiltrado linfóide, exocitose, células acidófilas contraídas, clivagem focal e separação entre o tecido epitelial e o conjuntivo são características histológicas da GVHDc em mucosa oral, úteis para diferenciá-la das alterações secundárias ao condicionamento.

3 – Infiltrado inflamatório linfocitário moderado, diminuição do número de ductos e ácinos e fibrose intersticial são as características histológicas mais evidentes da GVHDc em glândulas salivares menores, úteis para diferenciá-la das alterações secundárias ao condicionamento.

4 – O padrão de marcação imunoistoquímica para macrófagos, linfócitos T, e a subpopulação de linfócitos T citotóxicos mostrou valores estatisticamente diferentes entre os grupos controle e experimental, no tecido epitelial.

5 – No tecido conjuntivo subepitelial oral e nas glândulas salivares, os valores de marcação para macrófagos, linfócitos T, linfócitos T citotóxicos e auxiliares foram estatisticamente diferentes entre os grupos controle e experimental.

6 – O tecido conjuntivo subepitelial e as glândulas salivares menores, foram muito mais afetados pela GVHDc do que o tecido epitelial.

7 – As células predominantes na GVHDc foram linfócitos T citotóxicos, tanto no tecido epitelial e conjuntivo, como nas glândulas salivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1- Atkinson K. Chronic graft-versus-host disease (review). *Bone Marrow Transplantation* 1990; 5: 69-82.
- 2- Billingham RE. The biology of graft-versus-host reaction. *Harvey Lecture* 1966-1967; 62: 21-78.
- 3- Boström I, Ringden O, Sundberg B et al. Pretransplant herpesvirus serology and acute GVHD. *Transplantation* 1988; 46: 548.
- 4- Carlens S, Rigdén O, Remberger M et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single center analysis. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 755-761.
- 5- Chaushu G, Chaushu-Itzkovitz S, Yefenof E et al. A longitudinal follow-up of salivary secretion in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 164-169.
- 6- Correa MEP. Tese de mestrado: A mucosa oral e glândulas salivares acessórias na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica pós transplante de medula óssea: estudo prospectivo dos primeiros 63 transplantes de medula óssea; análise comparativa com parâmetros clínicos e biópsias de pele. *Hemocentro/Unicamp* 1999.
- 7- Curtis JW, Caughman GM. An apparent unusual relationship between rampant caries and the oral mucosal manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 267-272.

* De acordo com a revista *Bone Marrow Transplant*. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Index Medicus* de 1998.

- 8- Dens F, Boogaerts M, Boute P *et al.* Caries-related salivary microorganisms and salivary flow rate in bone marrow recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81: 38-43.
- 9- Eisner MD, & August CS. Impact of donor and recipient characteristics on the development of acute and chronic graft-versus-host disease following pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15: 663-668.
- 10- Epstein JB & Truelove EL. Topical cyclosporine in a bioadhesive for treatment of oral lichenoid mucosal reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 532-536.
- 11- Fujiwara K, Sakai Y, Sugiura J *et al.* Oral mucosal lesions in experimental graft-versus-host-disease: morphological and immunohistochemical characterization of infiltrating cells. *Oral Pathology & Medicine* 1996; 25: 315-319.
- 12- Galitis ON, Kitra V, Constantinidou CVV *et al.* The oral manifestations of chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in paediatric allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 148-153.
- 13- Gaziev D, Galimberti M, Lucarelli G *et al.* Chronic graft-versus-host disease: is there an alternative to the conventional treatment? *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 689-696.
- 14- Hasséus B, Jontell M, Brune M *et al.* Langerhans Cells and T Cells in oral graft versus host disease and Oral Lichen Planus. *Scand J. Immunol* 2001; 54: 516-524.

- 15-Heimdahl A, Jonhson G, Danielsson KH *et al.* Oral condition of patients with leukemia and severe aplastic anemia. Follow-up 1 year after bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 498-504.
- 16-Hiroki A, Nakamura S, Shinohara M *et al.* Significance of oral examination in chronic graft-versus-host disease. *Oral Pathology & Medicine* 1994, 23: 209-215.
- 17-Horn TD, Rest EB, Mirenski Y *et al.* The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogenic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1995; 13: 964-965.
- 18-Jacobsohn DA, Montross S, Anders V *et al.* Clinical importance of confirming or excluding the diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28: 1047-1051.
- 19-Jones LR, Toth BB, Keene HJ. Effects of total body irradiation on salivary gland function and caries-associated oral microflora in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 670-676.
- 20-Lee L, Miller PA, Maxymiw WG *et al.* Intraoral pyogenic granuloma after allogenic bone marrow transplant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 607-610.
- 21-Le Veque FG. An unusual presentation of chronic graft-versus-host disease in an unrelated bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 581-584.
- 22-LeVeque FG, Ratanatharathorn V, Dan ME *et al.* Oral cytomegalovirus infection in an unrelated bone marrow transplantation with possible

- mediation by graft-versus-host-disease and the use of cyclosporin-A. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 248-253.
- 23-Martin P. Overview of marrow transplantation immunology. In Forman SJ, Blume KG Thomas ED. *Bone Marrow Transplantation*; Seattle 1994: 16-21.
- 24-Mattsson T, Sundqvist KG, Heimdahl A *et al.* A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. *Archs Oral Biol* 1992; 37: 539-547.
- 25-Meyers JD. Infection in bone marrow transplant recipients. *Am J Med* 1986; 81: 27-38.
- 26-Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M *et al.* Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 556-563.
- 27-Nakhleh RE, Miller W, Snover DC. Significance of mucosal vs salivary gland changes in lip biopsies in the diagnosis of chronic graft-vs-Host Disease. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 932-934.
- 28-Rappeport J, Reinherz E, Mihm M *et al.* Acute graft-versus-host disease in recipients of bone marrow transplants from identical twin donors. *Lancet* 1979; 2: 717-720.
- 29-Redding SW, Callander NS, Haveman CW *et al.* Treatment of oral chronic graft-versus-host disease with PUVA therapy: case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86: 183-187.

- 30-Reiter E, Keil F, Brugger S *et al.* Excellent long-term survival after allogeneic marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 19: 1191-1196.
- 31-Rovelli A, Arrigo C, Nesi F *et al.* The role of thalidomine in the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease following bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21: 577-581.
- 32-Schubert MM, Epstein JB, Lloid ME *et al.* Oral Infections due to Cytomegalovirus in immunocompromised patients. *Oral Pathology & Medicine* 1993; 22: 268-273.
- 33-Schubert MM, Sullivan KM, Morton TH *et al.* Oral manifestations of chronic graft-v-host-disease. *Arch Intern Med* 1984; 144: 1591-1595.
- 34-Shulman HM, Sullivan KM, McDonald GB *et al.* Chronic Graft-versus-host syndrome in man. *The American Journal of Medicine* 1980; 69: 204-217.
- 35-Storb R, Thomas ED, Buckner CD *et al.* Allogenic marrow grafting for treatment of aplastic anemia: a follow-up on long term survivors. *Blood* 1976; 48: 485-490.
- 36- Thein SL, Goldman JM, Galton DA. Acute graft-versus-host disease after autografting for chronic granulocytic leukemia in transplantation. *Ann Intern Med* 1981; 94: 210-211.
- 37-VanBekkum DW & DeVries MJ. Radiation chimaeras. Radiobiological institute of the Organization for Health Research YNO, Rijswijk ZH Netherlands. *Academic Press* 1967; New York.

- 38-Vigorito AC, Azeedo Wm, Marques JFC *et al.* A randomized, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitors cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 1145-1151.
- 39-Villar CC. Tese de mestrado: análise comparativa das características microscópicas da lesão liquenóide na GVHD crônica e no líquen plano de boca. Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp 1999.
- 40-Vogelsang GB, Wagner JE. Graft-Versus-Host Disease. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1990; 4: 625-639.
- 41-Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-vs-Host Disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997, 8: 201-216.
- 42-Zecca M, Prete A, Rondelli R *et al.* Chronic graft-versus-host-disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002; 100: 1192-1200.

Paciente:

Bx:

UPN:

PG:

Mucosa Oral

() presente () ausente

Vacuolização das células basais:

() ausente () leve () moderada () intensa

Infiltrado inflamatório linfocitário:

() ausente () leve () moderada () intensa

Exocitose epitelial:

() ausente () leve () moderada () intensa

Células acidófilas contraídas com ou sem satellitose:

() ausente () leve () moderada () intensa

Clivagem focal entre o epitélio e o conjuntivo:

() ausente () presente

Separação entre o conjuntivo e o epitélio:

() ausente () presente

Imunoistoquímica:

CD 68: () Positivo () Negativo

CD 4: () Positivo () Negativo

CD 8: () Positivo () Negativo

Pan T: () Positivo () Negativo

Pan B: () Positivo () Negativo

GVHDc: () Grau I () Grau II () Grau III () Grau IV

Glândula Salivar:

() presente () ausente

Infiltrado inflamatório:

() ausente () leve () moderada () intensa

Diminuição do número de ductos e ácinos:

() ausente () leve () moderada () intensa

Dilatação ductal:

() ausente () leve () moderada () intensa

Metaplasia escamosa:

() ausente () presente

Fibrose intersticial:

() ausente () leve () moderada () intensa

Imunoistoquímica:

CD 68: () Positivo () Negativo

CD 4: () Positivo () Negativo

CD 8: () Positivo () Negativo

Pan T: () Positivo () Negativo

Pan B: () Positivo () Negativo

GVHDc: () Grau I () Grau II () Grau III () Grau IV



CEP, 19/11/02
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 441/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE CLÍNICA PATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE GVHDc EM GLÂNDULAS SALIVARES MENORES”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Andressa Borjes Soares

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/2002

II - OBJETIVOS

Descrever as características clínicas e histopatológicas e avaliar a expressão imunoistoquímica de CD68, PanB, PanT e CD8 em glândulas salivares menores de pacientes com Grafr-Versus-Host disease crônica, do Hemocentro do Hospital das Clínicas da FCM da UNICAMP, verificando os possíveis fatores associados ao desenvolvimento da doença.

III - SUMÁRIO

Serão selecionados 20 blocos de parafina correspondentes à biópsias realizadas em mucosa labial de pacientes que desenvolveram GVHDc, sendo que estas biópsias foram realizadas como parte do protocolo de tratamento para GVHDc do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Será realizado uma revisão das lâminas e um estudo de imunoistoquímica para detecção de CD68, PanB, PanT e CD8. A análise estatística será realizada por Fisher e Qui-quadrado.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de uma pesquisa realizada em blocos de parafina já coletados por protocolo anterior (os pacientes deram seu termo de consentimento, segundo os autores em fase anterior a esta pesquisa) e serão coletados dados dos prontuários.

Projeto simples, somente gostaríamos de observar que o cálculo do tamanho amostral não foi realizado e que serão incluídos apenas 20 casos o que torna o projeto quase um estudo piloto.

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 atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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.

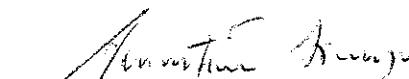
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também 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.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de novembro de 2002.



Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

