PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DA DOENÇA DO ENXERTO

CONTRA HOSPEDEIRO CRÔNICA DE MUCOSA ORAL

São Paulo

Paulo Sérgio da Silva Santos

Avaliação clínica e histológica da doença do enxerto-contrahospedeiro crônica de mucosa oral

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Marina G. Magalhães

São Paulo

2009

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Paulo Sérgio da Silva

Avaliação clínica e histológica da doença do enxerto-contrahospedeiro crônica de mucosa oral/ Paulo Sérgio da Silva Santos; orientador Marina G. Magalhães. -- São Paulo, 2009.

60p.: fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Doença Enxerto-Hospedeiro – Mucosa oral 2. Rejeição de enxerto 3. Patologia bucal

CDD 617.63 BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo,//	
Assinatura:	
F-mail·	

FOLHA DE APROVAÇÃO

Santos PSS. Avaliação clínica e histológica da doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica de mucosa oral [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, 01/07/2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a)		
	Assinatura:	
2) Prof(a). Dr(a)		
	Assinatura:	
3) Prof(a). Dr(a)		
	Assinatura:	
4) Prof(a). Dr(a)		
	Assinatura:	
5) Prof(a). Dr(a)		
	Assinatura:	

DEDICATÓRIA

À minha família, Marcia, Paulo Roberto e Tiago, pelo apoio incansável, pela compreensão das minhas ausências, pelo carinho e amor dedicado durante todo este período.

À minha orientadora, Prof^a. Marina G. Magalhães, por me aceitar como seu orientado, por ter paciência com as minhas dificuldades e limitações, pela disponibilidade nos momentos em que eu precisei durante a elaboração da tese.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal por me darem a oportunidade de cursar a pós-graduação, e pelo apoio sempre disponível diante das minhas necessidades e dúvidas.

Aos colegas da pós-graduação e do CAPE pela amizade e companheirismo, além da oportunidade de realizarmos alguns trabalhos juntos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças, saúde e clareza de raciocínio durante a elaboração desta pesquisa.

Aos meus pais, por terem me apoiado sempre na conquista de desafios como este.

Ao amigo Fábio Luiz Coracin, por sua participação direta, discussões e muitas vezes suporte de dúvidas durante a elaboração deste trabalho.

Á Elisa, pelo suporte técnico fundamental para o acontecimento desta pesquisa.

Às secretárias Zilda e Néia, por sempre me ajudarem com as questões burocráticas da pós-graduação.

Santos PSS. Avaliação clínica e histológica da doença do enxerto-contra-hospedeiro crônica de mucosa oral [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

A Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (GVHD) é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos ao Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH). As manifestações bucais podem ser debilitantes, levar a complicações sistêmicas e comprometer o prognóstico do paciente. O diagnóstico final deve ser estabelecido histologicamente. Recentemente o consenso estabelecido pelo NIH (National Institutes of Health) recomendou o uso de uma nova classificação histopatológica para o GVHD. No entanto a possível associação entre os quadros clínico e histopatológico de GVHD crônico (GVHDc), bem como a validação desta nova classificação ainda não estão claros na literatura. Desta forma, este estudo teve por objetivo validar a nova classificação, compará-la com outra já existente, correlacioná-la com o estágio clínico do GVHD e com a sobrevida dos pacientes transplantados. Para este estudo foram analisados biopsias de mucosa oral de 41 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de GVHDc. Os aspectos histopatológicos foram observados pelo autor deste trabalho e pelo seu orientador, de forma cega, aplicando os critérios de Horn e do Consenso. A classificação do Consenso mostrou se válida, fácil de ser aplicada e apresentou correlação com a classificação de Horn. Não houve correlação da classificação histológica com o estágio clínico da doença e casos classificados histologicamente como mais graves estavam relacionados com menor sobrevida.

Palavras-Chave: Rejeição de enxerto - Manifestações bucais - Transplante de Medula Óssea

Santos PSS. Clinical and histological evaluation of the chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The graft-versus Host Disease (GVHD) is the major cause of morbidity and mortality in patients undergoing Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The oral manifestations can be debilitating, leading to systemic complications and compromise the patient's prognosis. The final diagnosis must be established histologically. Recently the consensus established by the NIH (National Institutes of Health) recommended the use of a new classification for histopathological chronic GVHD (cGVHD). However, the possible association between clinical and histopathology of cGVHD, as well as validation of this new classification is not yet clear in the literature. Thus, this study aimed to validate the new classification, compare it with the existing, correlating it with the clinical stage of GVHD and the survival of transplanted patients. For this study we analyzed biopsies from oral mucosa of 41 patients with clinical and histopathological diagnosis of cGVHD. The histopathological features were observed by the author of this work and his supervisor, in a blinded fashion, using the criteria of consensus and Horn. A classification of consensus shown is valid, easy to apply and also correlated with the classification of Horn. There was no correlation with histological classification of the clinical stage of disease and cases histologically classified as more severe were associated with lower survival.

Keywords: Graft rejection – Oral manifestations – Bone Marrow Transplantation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCTH Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

GVHD/DECH Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro

GVHDa Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro aguda

GVHDc Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro crônica

MHC Complexo de histocompatibilidade principal

TMO Transplante de Medula Óssea

HLA Antígeno Leucocitário Humano

CMV Citomegalovírus

NIH National Institutes of Health

FOUSP Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

SPSS Statistical Package for Social Sciences

SUMÁRIO

	p
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

O Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é considerado o tratamento de escolha para muitas doenças que afetam a produção de "Steam cells" - célula mãe hematopoiética - e elementos do sistema imunológico. Os pacientes receptores de TCTH se submetem à severa imunodepressão para que o transplante não seja rejeitado pelo sistema imunológico do hospedeiro. A imunodepressão é induzida por quimioterapia e/ou radioterapia e objetiva preparar o receptor para receber a medula do doador. As células doadas atingem a medula óssea do receptor e multiplicam-se e passam a cumprir suas funções fisiológicas no hospedeiro. Apesar de hoje em dia este ser um tratamento muito empregado, ainda representa um procedimento de risco e está indicado apenas em doenças graves. As principais complicações do TCTH são infecções e a doença do enxerto versus hospedeiro (Graft-versus-Host Disease - GVHD)¹⁻³.

O GVHD surge quando células imunes funcionais da medula óssea transplantada atacam células e tecidos do organismo receptor. Esta complicação é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos ao TCTH⁴⁻⁸. Os pacientes acometidos por GVHD apresentam manifestações bucais que podem ser muito debilitantes e interferir no prognóstico da doença de base do paciente, aumentando o tempo de internação hospitalar, os custos do tratamento e comprometendo a qualidade de vida do paciente ^{5,9}.

O estabelecimento do diagnóstico final do GVHD deve ser estabelecido em base clínica e histopatológica. O diagnóstico precoce é importante para garantir terapia imediata e com isso melhor controle da doença. O dentista tem papel

fundamental nesse processo uma vez que as lesões bucais suspeitas podem ser facilmente visualizadas e com isso biopsiadas a tempo de serem tratadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

GVHD é uma complicação que ocorre pela ativação de células T em resposta a moléculas do complexo de genes de histocompatibilidade principal (MHC) alogênico subseqüente a um transplante de medula óssea (TMO) histocompatível ^{4,10}. As células T doadas reconhecem os antígenos do hospedeiro como estranhas. Isso resulta de uma fase aferente da estimulação dos linfócitos T (apresentação de antígenos, ativação e proliferação) e de uma fase referente da resposta das células T e células efetoras secundárias (secreção de citocinas, células T citotóxicas e macrófagos). Embora o GVHD possa ser prevenido pela remoção dos linfócitos T da medula do doador, essa manobra acarretaria o risco de falência do enxerto e recidiva da doença original, não sendo, por essa razão, muito utilizada ¹¹.

Classifica-se o GVHD em agudo (GVHDa) e crônico (GVHDc). O GVHDa se caracteriza pelo envolvimento de poucos órgãos, geralmente se manifesta antes do dia +100, e caracteriza-se histopatologicamente pela presença de apoptose e de necrose tecidual. No GVHDc há o envolvimento de vários órgãos, manifesta-se tardiamente, até anos após o TMO e a inflamação e a fibrose são características histopatológicas comuns ¹². Devemos salientar que a definição temporal de GVHD crônico é inadequada e pode gerar confusão nos ensaios de avaliação terapêutica para essa condição ⁸.

Os primeiros estudos sobre as alterações clínicas e histológicas do GVHD de mucosa oral foram descritos por Shulman et al em 1980, por meio de um estudo onde foram avaliados 20 pacientes transplantados de medula óssea alogênicos HLA

(Antígeno Leucocitário Humano) idênticos aparentados, com a lesão bucal. Os autores mencionaram a semelhança e possível sobreposição do GVHD com outras doenças do colágeno, tais como esclerodermia, insuficiência pulmonar e síndrome *sicca* e correlacionaram a gravidade das alterações clínicas com curta sobrevida dos pacientes com GVHD associado à infecção ¹³.

Após este estudo inicial, vários artigos publicados entre 1990 e 2005, passaram a descrever e estudar as alterações clínicas e histológicas do GVHD, com o objetivo de identificar os reais sintomas da doença e facilitar o diagnóstico diferencial com alterações provocadas por drogas, doenças do colágeno e com a própria doença de base dos pacientes. Além disso, com o desenvolvimento de estudos baseados em evidências clínicas, houve o interesse em analisar o papel preditivo do GVHD para o sucesso ou falha do TCTH ^{1,14-19}.

Existem vários fatores relacionados com a incidência e gravidade do GVHD.

Os fatores essenciais para a ocorrência do GVHD são: células T do doador

imunologicamente competentes; histo-incompatibilidade entre hospedeiro e doador; e inabilidade (requerida) do hospedeiro para rejeitar os linfócitos T do doador ¹¹. Um estado comprometido do sistema imune do paciente transplantado reduz o número de células T que, provavelmente, é insuficiente para controlar a resposta aos aloantigenos do enxerto²⁰.

Outros aspectos associados com a ocorrência de GVHD são grau de disparidade genética, em que as células T são capazes de diferenciar o próprio do não próprio através de seus receptores, os quais reconhecem os peptídeos produzidos pelo complexo MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior). No ser humano, o MHC é denominado sistema dos antígenos de leucócitos humano (HLA).

Há ainda antígenos de histocompatibilidade menores (MHA ou non-MHC), que são codificados por todo o genoma e representam diferenças alotípicas mais fracas em moléculas com várias funções. A incidência e gravidade de GVHD têm correlação direta com as disparidades no sistema HLA ¹¹.

Aproximadamente 50% dos pacientes transplantados de medula óssea apresentam algum grau de GVHD crônico ²¹, e, mesmo com intensa profilaxia imunossupressora, 10 a 50% dos enxertos HLA-idênticos, ideais para o transplante de medula óssea entre doador e hospedeiro, complicam-se clinicamente por um significativo GVHD, resultando diretamente em morte de 5 a 15% dos pacientes transplantados ^{2,7,11}.

Nos transplantados HLA-não idênticos, a incidência de GVHD é maior ainda e aumenta conforme o grau de disparidade entre o hospedeiro e o doador. Existem aproximadamente 50 antígenos menores que são transmitidos pela genitora como os epidérmicos, os antígenos masculinos específicos e os virais. Os antígenos virais, como os presentes em pacientes infectados por citomegalovírus (CMV) ou herpes, podem aumentar o risco da incidência de GVHD em pacientes submetidos TCTH ¹¹.

A idade avançada do hospedeiro e do doador tem sido associada a maior incidência de GVHD, devido a fatores imunológicos como o aumento de antígenos sensibilizados e a involução do timo ^{2,11,22}.

A seleção do tipo de droga utilizada como profilaxia imunossupressora interfere diretamente no grau de incidência de GVHD. Embora exista variação nos protocolos de profilaxia, a droga mais utilizada atualmente é o metotrexate (MTX) ou associação do MTX com Ciclosporina e esteróides. Combinações como Tacrolimus e MTX têm sido utilizadas mais recentemente ^{2,11,23}. Estudos adicionais na

prevenção do GVHD têm sido utilizados com drogas como o Sirolimus e o Micofenolato Mofetil (MMF) ².

Le Veque, em 1994 e Burt, em 1998, salientaram que a realização do TCTH em ambiente estéril, principalmente nos casos de anemia aplásica, e transplante de doador neutro ou sorologicamente negativo para vírus do herpes simples, Citomegalovírus e Epstein-Barr vírus eram aspectos associados com baixa incidência de GVHD^{11,24}. Mais tarde outros autores confirmaram esses achados especialmente em relação á sorologia negativa para os vírus da família do Herpes²⁵.

De acordo com a literatura, a porcentagem de indivíduos transplantados com GVHD como manifestação bucal, única ou associada a outros órgãos (pele, fígado e medula óssea), varia de 50 a 90% dos casos ^{3,26,27}. Desta forma a avaliação atenta da boca, com necessidade de realização biopsia, é importante no acompanhamento dos pacientes submetidos a TCTH ^{7,27,28}. Em 1990, Loughran et al (1990) defenderam a realização de biópsia de mucosa oral, mesmo que livre de lesão, a partir do dia +100, como forma preditiva do aparecimento do GVHD²⁹. Atualmente, acredita-se que a biopsia deva ser realizada em mucosa oral que exiba alterações macroscópicas, tais como úlcera e erosão, a fim de confirmar o diagnóstico de GVHDc ²⁷. O diagnóstico do GVHD requer no mínimo um sinal clínico e a biópsia, no mesmo órgão para sua conclusão ³⁰.

As manifestações clínicas podem ocorrer na mucosa oral, na pele, no fígado, no trato gastrointestinal e no sistema linfóide ³¹. A mucosa oral pode ser o primeiro sítio de manifestação da doença, levando à pesquisa e ao diagnóstico nos outros órgãos ¹¹.

Clinicamente, GVHD de mucosa oral pode ser subdividido em leve, moderado ou grave. Na mucosa bucal, ocorrem alterações semelhantes a líquen plano como

leucoedema, estrias brancas, ulcerações dolorosas, além de ardência bucal, xerostomia, mucocele e microstomia. Nos lábios, caracteriza-se por manchas maculopapulares e nos casos mais graves, lesões bolhosas devido à necrose da epiderme ^{3,11}.

A gradação em leve, moderada e grave é baseada em parâmetros clínicos, 30,32 , e é utilizada para a avaliação do GVHD de qualquer parte do corpo onde haja manifestação da doença. A análise histológica é realizada como auxiliar para a classificação e para o diagnóstico final do GVHD 33 . Especialmente no que diz respeito à eliminação dos diagnósticos diferenciais, especialmente reação à drogas e lesões causadas por agentes infecciosos 30,34 .

A confirmação clínica e histológica do GVHD oral é importante também no acompanhamento destes pacientes devido ao risco de desenvolvimento tardio de neoplasias bucais secundárias em pacientes que tiveram o diagnóstico do GVHD oral, além de causas como a profilaxia para o GVHD e a doença primária dentre outras ^{2,9,35-38}.

O GVHDc quando foi descrito em 1980 através do relato de 20 casos, foi classificado como: limitado, quando acometia pele e/ou fígado, ou extenso, quando acometia pele, fígado, olhos, mucosa oral e trato gastrointestinal, além de outros órgãos alvo ^{13,21}.

Mais tarde, em 2001, Akpek elaborou uma graduação para a avaliação clínica do GVHD crônico de mucosa oral baseada na sintomatologia bucal e na limitação do paciente para se alimentar³⁹. Segundo essa classificação o GVHD pode ser classificado em graus 1, 2 e 3 (Quadro 2.1) (Figuras 2.1 -).A, B, C, D, E, F, G e H)

- Grau 1 sem evidências de GVHD (diagnóstico histopatológico);
- Grau 2 sinais clínicos evidentes (xerostomia, sensibilidade bucal ao se alimentar, alterações mucosas liquenóides ou eritema e/ou úlceras);
- Grau 3 GVHD grave causando limitação ou perda funcional da ingesta alimentar, que requeiram analgesia e/ou alimentação por sonda

Quadro 2.1 - Graduação clínica do GVHD segundo AKPEK (2001)

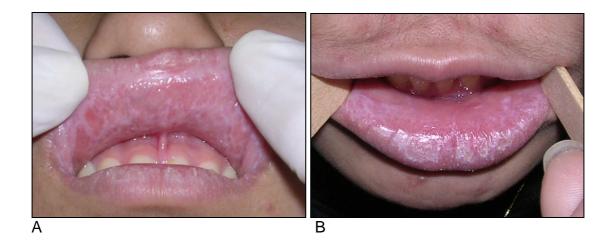


Figura 2.1 – A e B – GVHD em lábios Grau 2 (AKPEK)

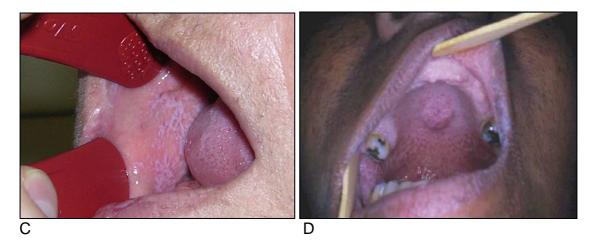


Figura 2.1 – C e D - GVHD em mucosa jugal e mucosa palatina Grau 2 (AKPEK)

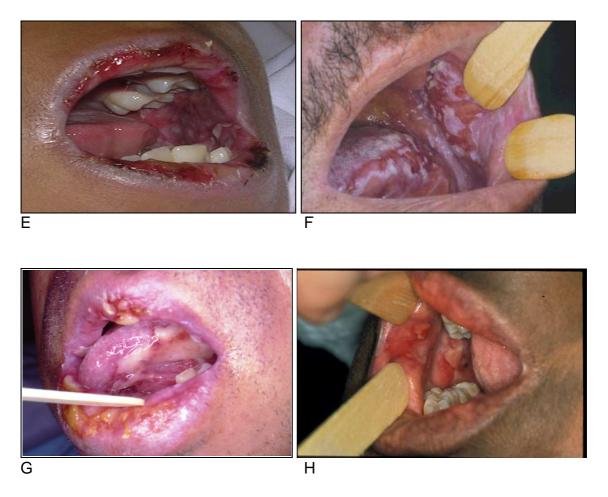


Figura 2.1 - E, F, G, H – alterações clínicas devido ao GVHD de mucosa oral Grau 3 (AKPEK)

Mais tarde, em 2005, o Consenso Clínico do National Institutes of Health (NIH) estabeleceu modificações na classificação de Akpek, tornando-a mais subjetiva e estabelecendo 4 "scores" para a doença: score 0 = sem sintomas, 1=

leve (com sinais da doença mas sem limitação significante de ingesta oral, 2= moderada com sinais da doença mas com limitação parcial de ingesta oral e 3= grave com sinais da doença mas com limitação importante de ingesta oral ³².

As manifestações de mucosa oral podem ou não estar associadas às manifestações de GVHD em outras regiões tais como dermatite (rash), hepatite e gastroenterite (diarréia e dores abdominais). Muitas vezes a manifestação bucal pode ser o primeiro sinal do acometimento generalizado da doença. Por esta razão, a avaliação freqüente e atenta da boca é de importância diagnóstica e prognóstica 1,30

Pacientes com GVHD leve têm prognóstico favorável e não necessitam de terapia. Já aqueles que apresentam vários órgãos acometidos (inclusive glândulas salivares menores e mucosa oral) têm histórico menos favorável ^{6,40}. Nesse contexto, o cirurgião-dentista participa melhorando a saúde bucal e diminuindo os riscos de infecções secundárias nas lesões do GVHD ^{1,2}.

As características histológicas do GVHD são inespecíficas e podem variar, especialmente, na dependência do órgão acometido. Na boca, o GVHD exibe alterações histológicas em epitélio e glândula salivar menor. No epitélio as alterações podem ser generalizadas ou localizadas e incluem inflamação liquenóide de interface, exocitose e apoptose. Nas glândulas salivares menores nota-se desde a presença de linfócitos com ou sem plasmócitos periductais e intraloburares, e exocitose de linfócitos dentro dos ductos intralobulares e ácinos e fibrose intralobular

Horn et al (1995), sugeriram uma graduação histológica para o GVHD oral, variando de grau 1 a 4, de acordo com as alterações presentes em mucosa oral e glândula salivar (Quadro 2.2)²⁸. Mais tarde, em 2006, Shulman et al, junto ao NIH em

um consenso, discutiram as alterações histopatológicas do GVHD em diversos tecidos, incluindo epitélio oral e glândulas salivares menores, e sugeriram uma nova classificação histopatológica. O consenso estabeleceu os critérios para a realização das biópsias e obtenção dos espécimes de lesões suspeitas de GVHD. A recomendação é de que as biópsias contenham epitélio e pelo menos 5 lóbulos de glândulas salivares menores. Também estabeleceu os critérios mínimos para diagnóstico histológico, definiu as alterações histológicas sugestivas de GVHD, definiu os aspectos que diferenciam o GVHD de outras condições, sugeriu os critérios clínicos relevantes que devem ser considerados junto com os aspectos histológicos, e, por fim, sugeriu um formulário para a inserção das características histológicas (Anexo B)³⁴.

Enquanto a classificação de Horn consiste numa gradação histológica baseada no grau de infiltração linfocítica e destruição dos ácinos glandulares, o sistema proposto pelo consenso reflete o estágio do GVHD. Desta forma 4 categorias diagnósticas podem ser estabelecidas pela classificação do consenso: sem GVHD, possível GVHD, provável GVHD, e GVHD (Quadro 2.3).

Grau I	Mucosa: vaculolização de células basais, moderado infiltrado linfocitário, moderada exocitose epitelial. Glândula salivar: moderado infiltrado intersticial
Grau II	Mucosa: vacuolização basal, células epiteliais disceratóticas, necrose dos ceratinócitos com satelitose, moderado a intenso infiltrado linfocitário na submucosa e moderada exocitose epitelial. Glândula salivar: moderada destruição acinar, dilatação ducatal, metaplasia escmosa, acúmulode muco, fibrose moderada, proliferação de células ductais e infiltrado linfocitário periductal.
Grau III	Mucosa: clivagem focal entre o epitélio e o cório, intenso infiltrado linfocitário no cório, células epiteliais disceratóticas, exocitose linfocitária. Glândula salivar: moderado infirltrado intersticial, destruição difusa dos ductos e ácinos.
Grau IV	Mucosa: separação entre o epitélio e o cório. Glândula salivar: completa perda dos ácinos, ductos acentuadamente dilatados e fibrose intersticial com ou sem infiltrado.

Sem GVHD	Sem evidências de GVHD		
Possível GVHD	Evidência de GVHD mas com outros possíveis diagnósticos	 CMV com inclusões próximas a alterações apoptóticas Úlceras focais associadas ao uso de MMF Coinfecção com hepatite viral ativa Características clínicas sugestivas de reação a drogas 	Indica possível diagnóstico adicional e razões para suspeita
Compatível com GVHD	Evidências claras de GVHD com atenuantes	 Evidências de muitas células apoptóticas epiteliais não associadas a infecção por CMV (imunohistoquímica) Únicas ou raras mudanças epiteliais apoptóticas sem outras caracerísticas de DECH ativa e sem explicações alternativas Amostra limitada ou mínimos ou focais achados Recente QT ou RXT 	Equivalente a compatível ou sugestivo de DECH
GVHD	Prova inequívoca de GVHD sem comentário adicional necessário	A inflamação pode ser mínima, mas com extensa destruição de epitélio e/ou glândulas	Se extensa destruição do epitélio, ductos ou forte inflamação, necessidade de tratamento secundário imunossupressor

Quadro 2.3 - critérios histológicos do consenso do NIH (SHULMAN, 2006)

As observações histológicas de lesões de GVHD não são específicas e podem variar de acordo com tempo decorrido entre o TCTH e a biopsia, tamanho da biópsia, número de cortes seriados, presença de área de ulceração, profundidade insuficiente, bem como coexistência de outros processos inflamatórios no local. Por essa razão têm sido postulado que as alterações histopatológicas não podem ser consideradas isoladamente do contexto clínico ^{27,34}.

Uma vez que no consenso de 2006 tenham sido estabelecidos critérios para o estabelecimento do diagnóstico histopatológico do GVHD, estes precisam agora ser aplicados.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi validar as recomendações do consenso histológico, em lâminas previamente diagnosticadas como GVHD.

Como objetivos secundários procuramos comparar a classificação histológica de Horn com a classificação proposta pelo consenso; a gravidade clínica das lesões de GVHD oral com a sua classificação histológica; e por fim procuramos correlacionar o diagnóstico histológico final com a curva de sobrevida dos pacientes estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas biopsias de lesões de GVHDc oral dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP e do Serviço de Patologia do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Os dados clínicos foram obtidos através da revisão dos prontuários dos pacientes, no Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e validado pelo CEP do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Anexo A).

Análise histopatológica

Foram analisados 60 biopsias de mucosa oral previamente diagnosticadas como GVHD, no Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Foi considerado como critério de exclusão, espécimes constituídos apenas por glândula salivar ou apenas epitélio. Em outras palavras, foram analisados os espécimes que continham epitélio e glândula salivar menos. Desta forma, 41 espécimes foram utilizados nesta pesquisa (Figura 4.1).

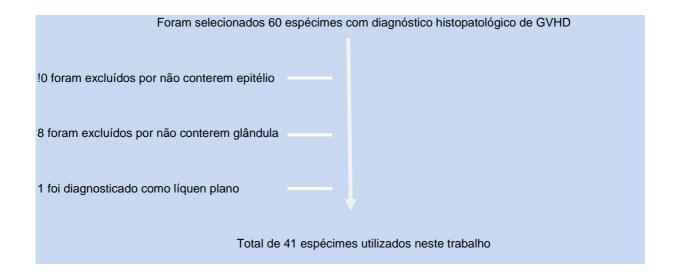


Figura 4.1 – Critérios de inclusão e exclusão

Os aspectos histopatológicos foram observados pelo autor deste trabalho e pelo seu orientador, de forma cega, sem conhecimento do diagnóstico ou classificação clínica, em microscópio de luz com múltiplas cabeças. Foram aplicados os critérios de Horn TD (1995), onde cada caso foi graduado em Grau I a IV, (Quadro 2.2) e os critérios propostos pelo consenso (Quadro 2.3), utilizando o formulário preconizado pelo mesmo (Anexo B).

A observação das lâminas obedeceu a seguinte seqüência: epitélio, lâmina própria e lóbulos de glândulas salivares.

No epitélio foram observadas a espessura (normal, atrófico, hiperqueratose e acantose), a presença de vacuolização, de apoptose, de espongiose, de atipia de queratinócitos, de exocitose de linfócitos, presença de outras células inflamatórias e espessamento da lamina basal. No tecido conjuntivo foi observado o tipo de célula prevalente no infiltrado inflamatório, sua distribuição em relação ao ducto salivar e em relação ao epitélio. Nas glândulas salivares procurou-se linfócitos dentro do ducto, infiltrado misto periductal, presença de linfócitos dentro dos ácinos, apoptose

nos ductos e ácinos, fibrose periductal, degeneração acinar, fibrose intersticial, ectasia ductal e perda de polaridade das células epiteliais do ducto.

Ao final das análises morfológicas, obtivemos dois laudos para cada caso: um, obedecendo aos critérios de Horn (Graus I a IV), e outro, obedecendo os critérios do consenso ("sem GVHD", "possível GVHD", "provável GVHD" e "GVHD").

Análise clínica

A coleta dos dados clínicos foi retrospectiva, realizada por meio da consulta aos prontuários dos pacientes. Todos os pacientes envolvidos neste estudo realizaram o TCTH na unidade de TMO do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e os prontuários envolvidos no estudo foram preenchidos pelo autor deste estudo.

Foram compilados os dados demográficos dos pacientes, a doença de base, o tempo decorrido entre o transplante e a biopsia e a sobrevida do paciente. Em seguida esses dados foram transferidos para um formulário especialmente desenvolvido para este estudo e inseridos em planilha excel para posterior análise estatística.

Os casos foram classificados clinicamente segundo Akpek, de grau 0 a 3 (quadro 2.2), considerando-s a presença ou ausência de reações liquenóides, gengivite descamativa, ulcerações, pseudomembranas, disfunção salivar, sensibilidade a alimentos, dor bucal, odinofagia, uso de medicação analgésica ou necessidade de alimentação enteral.

A avaliação da sobrevida dos doentes que desenvolveram GVHD foi baseada em dados retrospectivos dos prontuários. Os critérios utilizados para esta avaliação

foram transversais, seguindo a informação existente no momento da realização deste estudo. Não foi levantada a causa da morte dos doentes, mas somente a data do óbito.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS – Statistical Package for Social Sciences (v16.0), e avaliou a correlação entre as duas classificações histológicas, e entre estas e a classificação clínica. A análise descritiva utilizou freqüência para as variáveis qualitativas e média, desvio-padrão, erro padrão da média, mediana, valores mínimos e máximos para variáveis contínuas. Para a comparação entre as diferentes classificações foi utilizado o teste Exato de Fisher e o teste de correlação de Spearman. Para a análise descritiva das variáveis das alterações clínicas bucais foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney. Por fim relacionamos os aspectos histológicos e clínicos com a sobrevida dos pacientes utilizando a curva de Kaplan Meyer.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

As 41 biópsias de GVHDc receberam dois diagnósticos histopatológicos, sendo um segundo os critérios do consenso e outro segundo os critérios de Horn. A freqüência das alterações histológicas encontradas bem como os diagnósticos finais segundo os dois critérios seguidos estão resumidos no quadro 5.1.

As alterações mais frequentemente encontradas no epitélio foram: acantose 29(70,7%), exocitose de linfócitos 29(70,7%) e espessamento da lâmina basal 29(70,7%). Na lâmina própria o infiltrado inflamatório observado foi o intersticial, em 38(92,7%) casos, com predominância de linfócitos 41(97.61%). Nas glândulas salivares menores as alterações mais predominantes foram: fibrose periductal 38(92,7%), infiltrado crônico misto periductal 32(78%), ectasia ductal 30(73,2%), linfócitos circundantes e migrando para dentro dos ácinos 30(73,2%) e fibrose intersticial 29(70,7%) (Figura 5.1 – A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).

Alterações histológicas segundo o sítio observado		Biopsias
		observadas
		n = 41(100%)
<u>Epitélio</u>		
Espessura		
Atrófico		1(2,4%)
Hiperqueratótico		9(22%)
Acantose		29(70,7%)
Vacuolopatia basal		26(63,4%)
Apoptose de corpos eosinofílicos	>1/campo 10x	8(19,5%)
	<1/campo 10x	7(17,1%)
	ausentes	26(63,4%)
Espongiose		12(29,3%)
Atipia de queratinócitos		28(68,3%)
Exocitose de linfócitos		29(70,7%)
Exocitose de outras células inflama	atórias	1(2,4%)
Espessamento da lâmina basal		29(70,7%)
<u>Lâmina Própria</u>		
Distribuição do tipo de células		
Linfócitos		41(100%)
Plasmócitos		9(22%)
Eosinófilos		2(4,9%)
Neutrófilos		3(7,3%)
Mastócitos		3(7,3%)
Distribuição das células na lâmina	própria	(, ,
Infiltrado perivascular		9(22%)
Infiltrado periductal excretor		11(26,8%)
Infiltrado em banda		13(31,7%)
Infiltrado intersticial		38(92,7%)
Glândulas salivares mer	<u>nores</u>	
Linfócitos periductais SOMENTE c	om exocitose dentro do ducto	11(26,8%)
Infiltrado crônico misto periductal		32(78%)
Linfócitos circundantes e migrando	para dentro dos ácinos	30(73,2%)
Células apoptóticas nos ductos e á		0
Fibrose periductal		38(92,7%)
Degeneração acinar, fibrose inters	ticial, ectasia ductal	36(87,8%)
-	Degeneração acinar	25(61%)
	Fibrose intersticial	29(70,7%)
	Ectasia ductal	30(73,2%)
Perda de polaridade das células de	o ducto	13(31,7%)

Quadro 5.1 - Características histopatológicas encontradas nos 41 casos

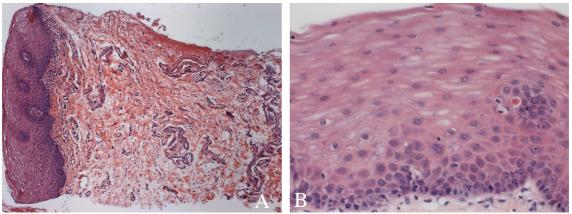


Figura A – Epitélio exibindo acantose, espessamento da lâmina basal e infiltrado inflamatório (10X); Figura B – epitélio exibindo exocitose de linfócitos, apoptose, vacuolopatia basal e atipia de queratinócitos (40X)

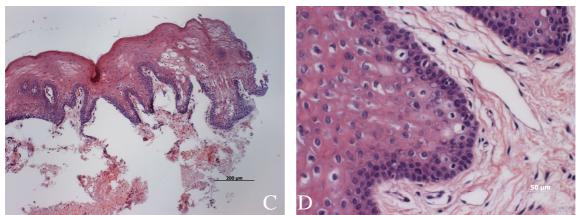


Figura C – Epitélio com destacamento do conjuntivo (10X); Figura D – epitélio exibindo atipia de queratinócitos, espessamento da lâmina basal (40X).

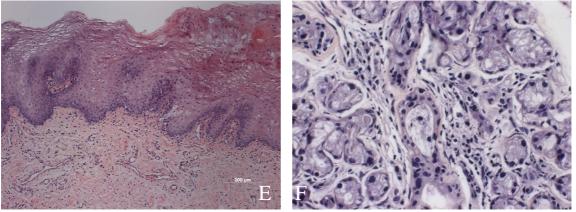


Figura E – epitélio exibindo acantose e espongiose (10X); Figura F – Glândula salivar exibindo linfócito dentro do ducto (40X).

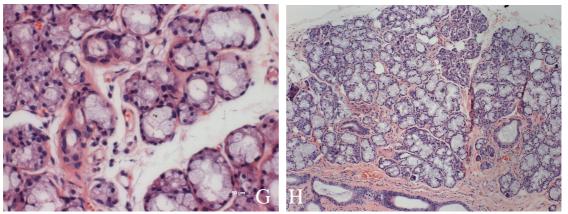


Figura G – Linfócitos migrando para dentro dos ácinos (40X); Figura F – Fibrose intersticial e periductal (10X).

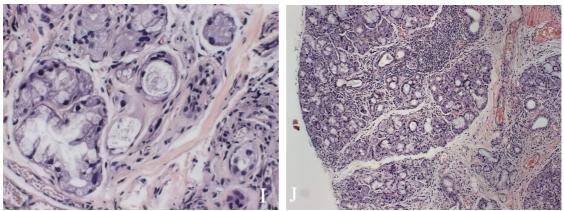


Figura I – Ectasia ductal (40X); Figura J – Glândula salivar menor exibindo degeneração acinar e infiltrado inflamatório intenso (10X).

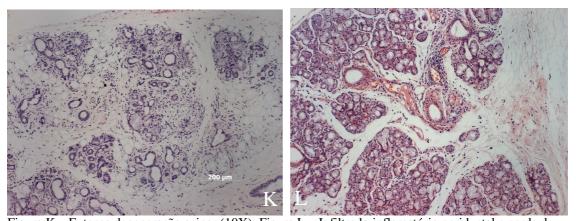


Figura K – Extensa degeneração acinar (10X); Figura L – Infiltrado inflamatório periductal e perda de polaridade das células do ducto (10X).

5.2 Análise clínica

A análise clínica retrospectiva dos prontuários dos pacientes revelou que, a maioria das lesões biopsiadas tinha aspecto liquenóide 40(97,6%), a maioria dos pacientes se queixava de sensibilidade bucal ao se alimentar 38(92,7%), e tinham sensação de boca seca com notada disfunção salivar 36(87,8%). Os pacientes foram classificados de acordo com a classificação de Akpek (2001) e as informações clínicas estão resumidas no quadro 5.2. A graduação clínica final mostrou que 31 dos 41 pacientes (77,5%) exibiam GVHD grau 1 e que 9 dos 41(22,5%) exibiam grau 2, no momento da biópsia.

Sinais e Sintomas Clínicos	Pacientes
	n=41(100%)
Alterações liquenóides	40(97,6%)
Sensibilidade bucal ao se alimentar	38(92,7%)
Disfunção salivar	36(87,8%)
Gengivite descamativa	27(65,9%)
Dor bucal	26(63,4%)
Odinofagia	19(46,3%)
Ulcerações	18(43,9%)
Pseudomembranas	14(34,1%)
Necessidade de analgesia ou alimentação enteral	8(19,5%)

Quadro 5.2 – Resultados dos sinais e sintomas encontrados nos pacientes avaliados, segundo os critérios de Akpek(2001)

Quanto à sobrevida após o tratamento, 27(65,9%) pacientes sobreviveram por pelo menos 12 anos e 14(34,1%) vieram a óbito entre 1 mês a 3 anos após o transplante, devido a complicações do tratamento ou em decorrência da doença de base. A curva de sobrevida global dos pacientes foi calculada desde o dia TMO até

o óbito, ou até o término do presente estudo, no mês de fevereiro de 2009, sendo a sobrevida média dos pacientes de 111,52 meses (EP=10,27) (Gráfico 1).

5.3 Análise estatística

Houve relação estatisticamente significativa entre as graduações histopatológicas do consenso e de Horn (1995) (Teste Exato de Fisher, p=0,001) (Quadro5.3) (Anexo C). Em outras palavras, os casos classificados pelo consenso como possível GVHD foram compatíveis com grau I (Horn), os diagnósticos de provável GVHD foram correspondentes ao grau II (Horn), e nos diagnósticos de GVHD foram classificados como graus III e IV de Horn (Gráfico 5.1).

Classificação Horn	Grau	N [®] biópsias(%)
	Grau 0	1(2,5%)
	Grau 1	4(10%)
	Grau 2	26(65%)
	Grau 3	9(22,5%)
	Grau 4	1(2,5%)
Classificação consenso		
	Sem GVHD	1(2,5%)
	Possível GVHD	16(40%)
	Provável GVHD	15(37,5%)
	Com GVHD	8(20%)
Relação entre as graduações		p=0,001

Quadro 5.3 – Classificação final das alterações histológicas

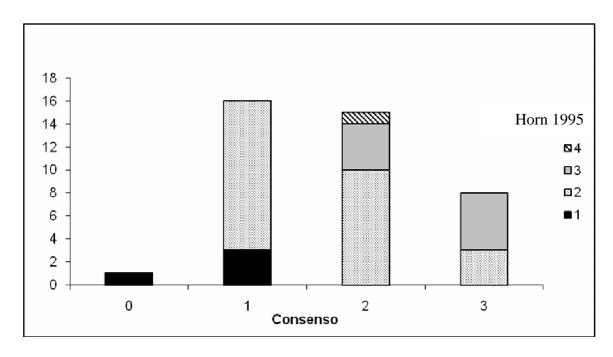


Gráfico 5.1 – Classificação do diagnóstico final "Consenso X Horn 1995"

De modo geral, na maioria dos espécimes analisados (36/41 – 87,8%) foram encontrados degeneração acinar e/ou fibrose intersticial e/ou ectasia ductal. Este correspondia a 1 ítem do formulário preconizado pelo consenso. Analisando o diagnóstico histológico final obtido com a ocorrência de cada achado pertencente a esse mesmo item encontramos: quanto à degeneração acinar 8(32%) com possível GVHD, 10(40%) provável GVHD e 7(28%) com GVHD, sem diferença estatística (p=0,19)(Gráfico 5.2); quanto à fibrose intersticial 8(27,6%) com possível GVHD, 13(44,8%) com provável GVHD e 8(27,6%) com GVHD com diferença estatística (p=0,01)(Gráfico 5.3); e, quanto à ectasia ductal 12(40%) com possível GVHD, 13(43,3%) provável GVHD e 5(16,7%) com GVHD, sem diferença estatística (p=0,22)(Gráfico 5.4). Esses dados mostram que, no nosso estudo, a fibrose intersticial teve um papel fundamental na diferenciação e estabelecimento do grau histológico. Quando considerada a classificação de Horn, houve relevância estatística para degeneração acinar (p=0,01), fibrose intersticial (p=0,02) e ectasia ductal (p<0,001) (Anexo C).

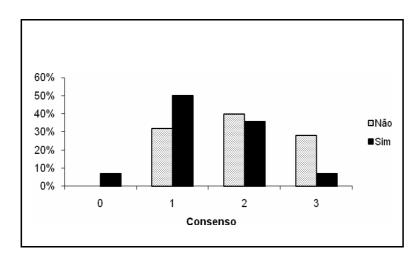


Gráfico 5.2 - Porcentagem de degeneração acinar em relação ao diagnóstico final do Consenso

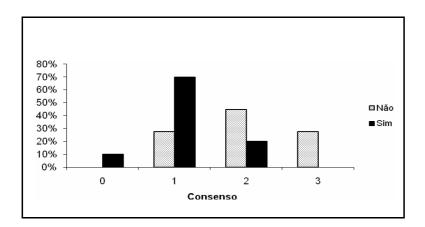


Gráfico 5.3 - Porcentagem de fibrose intersticial em relação ao diagnóstico final do Consenso

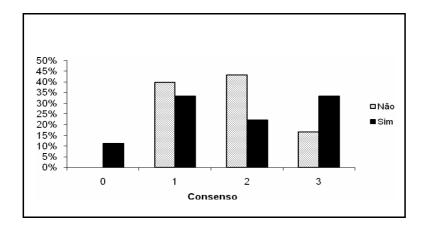


Gráfico 5.4 - Porcentagem de ectasia ductal em relação ao diagnóstico final do Consenso

Não foi encontrada correlação entre os diferentes graus do diagnóstico clínico do GVHD com a gradação histopatológica (Teste Exato de Fisher: p=0,55 Akpek versus Consenso, e p=0,37 Akpek versus Horn) (Anexo C)(Gráficos 5.5 e 5.6).

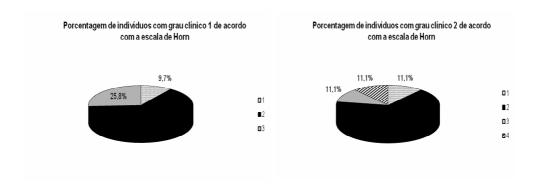


Gráfico 5.5 – Comparação do grau de diagnóstico clínico de Akpek correlacionando com o diagnóstico histológico final de HORN

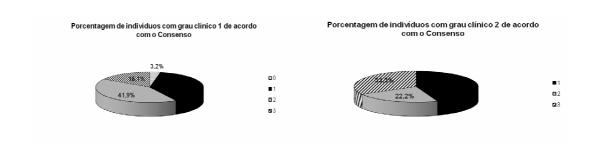


Gráfico 5.6 – Comparação do grau de diagnóstico clínico de AKPEK correlacionando com o diagnóstico histológico final do Consenso

A Sobrevida Média dos pacientes considerando a variável biópsia como tempo foi de 1104,10 dias, com Erro Padrão da média (EP=125,01)(Gráfico 5.7). Não houve diferença estatística na análise da relação entre graus histológicos mais graves do GVHD (provável GVHD e GVHD/ III e IV) com o óbito (p=1,00 – Consenso) e

(p=0,58 - Horn). No entanto os gráficos 5.8 e 5.9 mostram que pacientes com diagnóstico final sem GVHD (grau 0) e com possível GVHD (grau 1) tiveram sobrevida maior que pacientes com provável GVHD (grau 2) e com GVHD (grau 3).

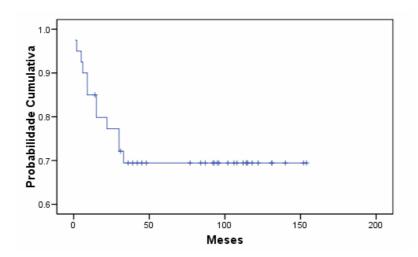


Gráfico 5.7 - Curva de sobrevida global dos pacientes calculada desde o dia TMO até o óbito por qualquer causa, até o término do presente estudo. (Kaplan-Meier)

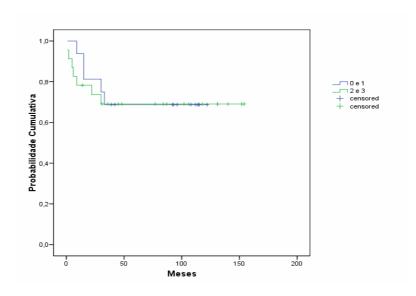


Gráfico 5.8 – Sobrevida dos pacientes desde o dia do transplante até o óbito, considerando a gravidade histológica (classificação do consenso 2006): Grau 0 – sem GVHD, Grau 1 – Possível GVHD, Grau 2 – Provável GVHD e Grau 4 - GVHD

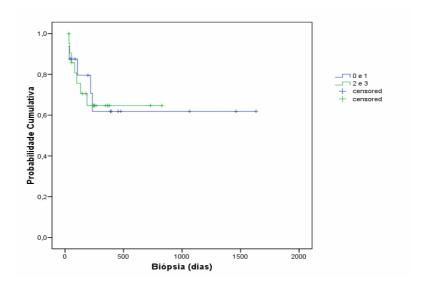


Gráfico 5.9 - Sobrevida dos pacientes considerando a variável biópsia como tempo, e a gravidade histológica pela classificação do consenso (2006): Grau 0 - sem GVHD, Grau 1 - Possível GVHD, Grau 2 - Provável GVHD e Grau 4 - GVHD

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico e histológico do GVHD de mucosa oral é um tema bastante polêmico e discutido, principalmente quanto à relevância dos achados bucais e sua relação com o diagnóstico da lesão em outros órgãos.

Embora a aplicação de critérios para o diagnóstico clínico permita melhor comunicação entre os profissionais da saúde que acompanham o paciente e facilite a avaliação da eficiência terapêutica, a classificação clínica do GVHD oral não tem sido aplicada rotineiramente. Percebemos esse fato quando recebemos biópsias de lesões suspeitas ou fortemente sugestivas de GVHD, sem, no entanto, a menção ou o conhecimento por parte do profissional, de qualquer classificação clínica.

No presente estudo, a utilização da classificação de Akpek (2001) possibilitou nos padronizar os resultados clínicos obtidos, tornando possível pesquisarmos a correlação entre a gravidade clínica do GVHD bucal com a gradação histopatológica. Como não houve relevância estatística (p=0,55) na correlação entre a gravidade clínica (Akpek) e graduação histológica, estes achados sugerem que o critério clínico de diagnóstico do GVHD é relevante para a instituição da terapia tópica de suporte, mas não reflete as alterações histopatológicas das glândulas salivares e de epitélio, os quais são importantes para o estadiamento do GVHD do paciente como um todo. Acreditamos ainda que a ausência de correlação clínica e histopatológica não diminui a importância da identificação e classificação clínica e histológica do GVHD. Diante da presença clínica da lesão, realiza-se a biópsia, cujo resultado histopatológico indica o grau de destruição acinar e de alterações em epitélio o conjuntivo. Também acreditamos que, apesar de não termos encontrado correlação

entre achados histológicos e clínicos, a biópsia deva ser sempre realizada em lesões de mucosa oral de pacientes transplantados, para que seja possível o diagnóstico diferencial com lesões infecciosas ou reação a medicamentos. Nesses casos os tratamentos instituídos seriam totalmente diferentes, uma vez que o GVHD é tratado com imunossupressores.

Na avaliação histológica percebemos que o epitélio e lâmina própria mostram sinais de resposta inflamatória evidente na maioria dos casos observados. No entanto estas alterações não são exclusivas do GVHD, e o diagnóstico diferencial se faz com ser decorrentes da ação dos quimioterápicos e do uso de outras drogas pós-transplante ²⁵.

As alterações histológicas no GVHD possivelmente ocorram devido à alta expressão tecidual dos antígenos de histocompatibilidade pelos tecidos salivares e a acessibilidade dos linfócitos patogênicos para as glândulas ⁴¹. As células T alorreativas do enxerto são especificamente direcionadas contra os antígenos do hospedeiro de maior ou menor histocompatibilidade, especialmente CD8, CD 25, TIA-1 e HLA-DR, e estão elevadas no GVHD crônico ⁴².

Dentre os sítios da mucosa analisados histologicamente, as alterações em glândulas salivares menores foram, em nossa casuística, as mais evidentes e fáceis de serem reconhecidas. O epitélio de todos os espécimes apresentaram alterações histopatológicas, especialmente acantose, exocitose, espessamento de lâmina basal e atipia de queratinócitos. Mas, ao contrário dos achados de Soares et al, foi rara a ocorrência de fendas entre o epitélio e o conjuntivo. Esses autores observaram a presença da fenda em 32% dos 25 casos de GVHD analisados, enquanto nós observamos a fenda em apenas um caso (2,4%).

Apesar de não termos encontrado significância estatística, o alto grau de acometimento histologicamente comprovado das glândulas salivares com o achado clínico de que 87,8% dos pacientes avaliados neste estudo apresentaram disfunção salivar (boca seca) não pode ser desprezado. De acordo com a literatura, pacientes com GVHD exibem comumente a hipofunção e alteração da composição salivar acompanhados das alterações histológicas das glândulas 43. Neste estudo foi observado no exame histológico das glândulas salivares menores, freqüente infiltrado inflamatório misto periductal, fibrose periductal, degeneração acinar, fibrose intersticial e ectasia ductal. Estas alterações são explicadas pelo mecanismo patogenético para o envolvimento das glândulas salivares no GVHD que é composto por: HLA up-regulation, infiltrado mononuclear e desregulação das citocinas 44. Recentemente várias citocinas, incluindo IL-2, IL-6, IFNγ, TNFα e fator de crescimento insulina-like, foram relacionadas com as funções das células salivares e com a produção das imunoglobulinas salivares e/ou saliva. É possível que uma maciça infiltração linfocítica e aberrante produção de citocinas sejam responsáveis pelas alterações teciduais das glândulas salivares que induzem ao GVHD 43.

Em nossa análise de sobrevida e sua relação com a gravidade histológica do cGVHD oral (p>0,05) pudemos observar que pacientes com diagnóstico histológico de "provável GVHD" e "com GVHD" tiveram menor sobrevida quando comparados aos pacientes com os pacientes "com possível GVHD" e "sem GVHD", mas essa diferença não foi estatisticamente significante. Acreditamos que esses resultados não tenham tido significância estatística, pois nenhum de nossos casos foi classificado como grau 3 de Akpek. No entanto pacientes com diagnóstico final sem GVHD (grau 0) e com possível GVHD (grau 1) tiveram sobrevida maior que pacientes com provável GVHD (grau 2) e com GVHD (grau 3).

Poucos trabalhos na literatura avaliam a relação do GHVD oral com a sobrevida do paciente. Em um deles, analisando a sobrevida dos indivíduos com cGVHD, Pasquini (2008) demonstrou a gravidade das manifestações do cGVHD, entre elas as manifestações orais levam a menores scores de Karnofsky Performance. Trata-se de um score subjetivo, de 0 (zero) a 100, que mede a capacidade do indivíduo exercer suas atividades diárias e grau de independência física e mental. Este índice avalia a condição física geral do paciente, e Pasquini demonstrou que um Karnofsky menor foi relacionado com maior índice de mortalidade⁴⁵.

No momento da leitura das lâminas, foram encontradas algumas dificuldades na aplicação do consenso histopatológico, como por exemplo: mensurar, nas colorações de rotina, ou seja, hematoxilina e eosina, o espessamento da lâmina basal; determinar a intensidade do infiltrado inflamatório, uma vez que essa determinação é muito subjetiva; avaliar a relevância da espongiose em epitélio de lábio, uma vez que geralmente se encontra essa alteração em pacientes normorreativos; identificar alterações citopáticas de origem viral.

Segundo as orientações e formulário propostos pelo consenso, no que diz respeito à identificação no epitélio de apoptose e presença de corpos eosinofílicos, encontramos algumas dificuldades. Primeiramente no que diz respeito ao uso da lente de aumento de 10X com a qual é difícil identificá-los. Outra questão é a orientação quanto ao número destas alterações encontradas por campo de 10X. Existem as opções: mais de 1 alteração, menos de uma alteração ou nenhuma alteração, o que dificultou a validação deste item.

Como sugestão prática para a validação da leitura histológica do GVHD de mucosa oral salientamos a necessidade do desmembramento do item "degeneração"

acinar, fibrose intersticial e ectasia ductal" em 3 itens independentes. A relevância estatística encontrada quando relacionada a fibrose intersticial e o diagnóstico final deixou clara a importância desta alteração intralobular na avaliação da gravidade histológica do GVHD.

A adequação da ocular para um aumento de 40x para observação de apoptose epitelial foi considerada relevante na investigação desta alteração no epitélio. A mensuração da espessura da lâmina basal seria melhor evidenciada se utilizada a microscopia eletrônica. Por meio de microscópio óptico, a coloração por ácido periódico-Schiff (PAS+) facilita a visualização da membrana normal (1μm a 4 μm) ⁴⁶.

Analisando a aplicação das gradações de Horn e do Consenso, observamos que apesar de Horn descrever mais detalhadamente as alterações em epitélio e glândulas salivares, a gradação conjunta destas duas estruturas, dificulta o diagnóstico histopatológico final. Já a classificação do consenso, apesar de sua subjetividade, tem aplicação mais fácil, direcionando o patologista para uma conclusão diagnóstica mais acurada. Neste estudo observamos que há correlação entre as duas gradações (p = 0,001).

De acordo com o consenso a decisão do diagnóstico final histopatológico entre possível e provável tem grande relação com a suspeita de achados que direcionem para o possível diagnóstico de uma infecção viral, principalmente pelo Citomegalovírus (CMV). Esta relação entre GVHD e CMV é discutida na literatura. Alguns autores não encontraram a relação da presença do GVHD e a infecção por CMV ^{47,48}, e outros estudos sugerem a presença de infecção por CMV e a destruição tecidual em epitélio e glândulas salivares em pacientes com sinais clínicos de GVHD ^{49,50}. Nos casos com suspeita de infecção por CMV é aconselhável descartar o

diagnóstico desta infecção viral através do teste de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)⁴⁸, ou através da antigenemia, a qual podem ter resultado negativo mesmo com o paciente com infecção por CMV tecidual ⁵¹.Tanto a infecção apenas confinada no tecido, bem como na circulação deverão ser manejadas pelo médico transplantador.

O fato de não existir relação entre a gravidade clínica e a gravidade histológica do GVHD crônico de mucosa oral, não implica no descarte da analise histológica, pois sua relevância é importante no diagnóstico diferencial com processos infecciosos. A conduta frente ao GVHDc deve levar em consideração os achados clínicos mas a confirmação histológica favorece a relação entre o clínico e patologista para as decisões terapêuticas. A análise histológica foi facilitada pelo formulário proposto pelo consenso, e sua validação necessita ainda de mais estudos longitudinais para a elaboração de um critério final.

7 CONCLUSÕES

- A gravidade clínica do GVHDc oral não apresenta correlação com a gravidade histológica com relevância estatística.
- A validação da classificação histológica do GVHDc proposta pelo consenso pôde ser aplicada no grupo de pacientes estudados.
- Há correlação entre a classificação proposta por Horn et al.(1995) e o consenso proposto pelo Consenso (2006).
- Recomendamos o desmembramento do ítem "degeneração acinar/fibrose intersticial/ectasia ductal", do formulário da classificação do consenso, dando destaque à fibrose intersticial relacionada à maior gravidade histológica do GVHD em glândulas salivares menores.
- A gravidade histológica do GVHDc oral pode interferir na sobrevida global do paciente submetido à TCTH.

REFERENCIAS1

- Santos PSS, Lima RB, Magalhães MHCG. Graft-Versus-Host-Disease in patients submitted to bone marrow transplantation – case report. RPG Rev Pós-Grad 2005;12:506-11.
- 2. Schubert MM, Correa ME. Oral graft-versus-host disease. Dent Clin North Am 2008;52(1):79-109.
- 3. Treister NS, Cook Jr. EF, Antin J, Lee SJ, Soiffer R, Woo SB. Clinical evaluation of oral chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:110-5.
- 4. Armitage JO. Bone marrow transplantation. N Engl J Med 1994;330(12):827-37.
- 5. Eisen D, Essel J, Vroun ER. Oral cavity complications of bone marrow transplantation. Semin Cutan Med Surg 1997;16(4):265-72.
- 6. França CM, Domingues-Martins M, Volpe A, Pallotta Filho RS, Soares de Araújo N. Case report Severe oral manifestations of chronic graft-vs.-host disease. J Am Dent Assoc 2001;132(8):1124-7.
- 7. Lu Y, Sakamaki S, Kuroda H, Kusakabe T, Konuma Y, Akiyama T, *et al.* Prevention of lethal acute graft-versus-host disease in mice by oral administration of T helper 1 inhibitor, TAK-603. Blood 2001;97(4):1123-30.
- 8. Farag SS. Chronic graft-versus-host disease: where do we go from here? Bone Marrow Transplant 2004;33:569–5.
- Rizzo DJ, Wingard JR, Tichelli A, Lee SJ, Van Lint MT, Burns LJ, et al. Recommended Screening and Preventive Practices for Long-term Survivors after Hematopoietic Cell Transplantation: Joint Recommendations of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, the Center for International Blood and Marrow Transplant Research, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:138-51.

-

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

- 10. Pérez DA, Beirana AP, Castro AF. Enfermedad injerto contra huésped. Rev Cent Dermatol Pascua 2000;9(2):74-80.
- 11. Burt R, Deeg J, Lothan S.T, Santos G. Bone marrow transplantation, Seattle, RG Landes Company; 1998. cap11, p 478-97.
- 12. Lee SJ. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. Blood 2005;105(11):4200-6.
- 13. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man: A long-term clinicopathologic study of 20 seattle patients. Am Journal of Med 1980;6(2):204-17.
- 14. Schubert MM, Sullivan KM, Morton TH, Izutsu KT, Peterson DE, Flournoy, Net al. Oral manifestations of chronic graft-v-host disease. Arch Intern Med. 1984;144(8):1591-5.
- 15. Medina JE, Frame R, Toth B, Nguyen L, Luna MH. Head and neck manifestations of the chronic graft vs. host disease. Laryngoscope 1984 Sep;94(9):1145-51.
- 16. 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(8):932-4.
- 17. Schubert MM, Sullivan KM. Recognition, incidence, and management of oral graft-versus-host disease. NCI Monogr 1990;(9):135-43.
- 18. Nakamura S, Hiroki A, Shinohara M, Gondo H, Ohyama Y, Mouri T, et al. Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod 1996;82(5):556-63.
- 19. Soares AB, Faria PR, Magna LA, Correa ME, de Sousa CA, Almeida OP, et al. Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. J Oral Pathol Med 2005;34:368–73.

- 20. Faria BA, Silva SM, Abreu MTCL, Napimoga MH. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. Rev Bras Hematol Hemoter 2008;30(4):309-15.
- 21. Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. Blood Rev 2006;20:15-27.
- 22. Lee JW, Deeg HJ. Prevention of chronic GVHD. Best Pract & Res Clin Haematol 2008;21(2):259-70.
- 23. Chao NJ, Chen BJ. Prophylaxis and treatment of acute graft-versus-host disease. Semin Hematol 2006;43:32–41.
- 24. LeVeque FG, Ratanatharathorn V, Dan ME, Orville B, Coleman DN, Turner S. Oral cytomegalovirus infection in an unrelated bone marrow transplantation with possible mediation by graftversus- host disease and the use of cyclosporin-A. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1994;77:248-53.
- 25. Sedghizadeh PP, Allen CM, Anderson KE, Kim DH, Kalmar JR, Lang JC. Oral graft-versus-host disease and programmed cell death: Pathogenetic and clinical correlates. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:491-8.
- 26. Arora M, Burns LJ, Davies SM, Macmillan ML, Defor TE, Miller WJ, et al. Chronic graft-versushost disease: a prospective cohort study. Biol Blood Marrow Transplant 2003;9:38-45.
- 27. Lee SJ, Flowers MED. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. Hematology 2008;2008:134-41.
- 28. Horn TD, Rest EB, Mirenski Y, Corio RL, Zahurak ML, Vogelsang GB. The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. Arch Dermatol 1995;131(8):964-5.
- 29. Loughran Jr TP, Sullivan K, Morton T, Beckham C, Schubert M, Witherspoon R, et al. Value of Day 100 Screening Studies for Predicting the Development of Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. Blood 1990;76(1):228-34.

- 30. Filipovich AH. Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease Best Pract Res Clin Haematol 2008;21(2):251–57.
- 31. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. Annu Rev Med 2003;54:29–52.
- 32. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11:945-55.
- 33. Martin PJ, Weisdorf D, Przepiorka D, Hirschfeld S, Farrell A, Rizzo JD, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12(5):491-505.
- 34. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E, et al. Histopathologic Diagnosis of Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:31-47.
- 35. Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, O'Donnell MR, Fung H, Kashyap A, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. J Clin Oncol 2001;19:464–71.
- 36. Szeto HC, Shek TWH, Lie AKW, Au WY, Yuen APW, Kwong YL. Squamous Cell Carcinoma of the tongue complicating chronic oral mucosal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Am J Hematol 2004;77:200–2.
- 37. Demarosi F, Lodi G, Carrassi A, Soligo D, Sardella A. Oral malignancies following HSCT: Graft versus host disease and other risk factors. Oral Oncol 2005;41:865–77.
- 38. Curtis RE, Metayer C, Rizzo JD, Socié G, Sobocinski KA, Flowers ME, et al. Impact of chronic GVHD therapy on the development of squamous-cell cancers after hematopoietic stem-cell transplantation: an international case-control study. Blood 2005;105:3802–11.

- 39. Akpek G, Zahurak ML, Piantadosi S, Margolis J, Doherty J, Davidson R, et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. Blood. 2001;97(5):1219-26.
- 40. Nicolatou-galitis O, Kitra V, Van Vliet-Constantinidou C, Peristeri J, Goussetis E, Petropoulos D, 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(3):148-53.
- 41. Imanguli MM, Alevizos I, Brown R, Pavletic SZ, Atkinson JC. Oral graft-versushost disease. Oral Dis 2008;14:396–412.
- 42. Auw-Haedrich C, Potsch C, Böhringer D, Mittelviefhaus H, Maier P, Reinhard T, et al. Histological and immunohistochemical characterization of conjunctival graft vs host disease following haematopoietic stem cell transplantation. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2006;245(7):1001-7.
- 43. Nagler RM, Nagler A. Salivary gland involvement in Graft-versus-Host Disease: the Underlying mechanism and implicated treatment. IMAJ 2004;6:167-72.
- 44. Izutsu KT, Sullivan KM, Schubert MM. Disordered salivary immunoglobulin secretion and sodium transport in human graft-versus-host disease. Transplantation 1983;35:441-6.
- 45. Pasquini MC. Impact of graft-versus-host disease on survival. Best Pract Res Clin Haematol 2008;21(2):193–204.
- 46. Bashkar SN. Histologia e embriologia oral de Orban. 10ª ed.Tradução: Martello ND. São Paulo: Editora Artes Médicas; 1989.
- 47. Mariette X, Cazals-Hatem D, Agbalika F, Selimi F, Brunet M, Morinet F, et al. Absence of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus expression in labial salivary glands of patients with chronic graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 1996;17(4):607-10.
- 48. Correia-Silva J de F, Victória JM, Guimarães AL, Salomão UE, de Abreu MH, Bittencourt H, et al. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. Oral Dis 2007 Mar;13(2):163-9.

- 49. Quiquandon I, Janin A, Noel-Walter MP, Facon T, Morel P, Copin MC, et al. Cytomegalovirus expression in minor salivary glands and chronic graft-versushost disease. Bone Marrow Transplant 1994;14(1):31-5.
- 50. Soderberg C, Larsson S, Rozell BL, Sumitran-Karuppan S, Ljungman P, Moller E. Cytomegalovirus-induced CD13-specific autoimmunity--a possible cause of chronic graft-vs-host disease. Transplantation. 1996;61(4):600-9.
- 51. Tan BH, Chlebicka NL, Low JG, Chong TY, Chan KP, Goh YT. Use of the cytomegalovirus pp65 antigenemia assay for preemptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a real-world review. Transpl Infect Dis 2008;10(5):325-32.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaro para fins junto ao Comitê de Ética, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise da correlação clínica e histológica da DECHc de mucosa oral", do aluno do curso de Doutorado do Programa de Patologia Bucal da FOUSP, PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS será realizado no Laboratório Imunohistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

Por ser verdade, assumo total responsabilidade pela informação.

São Paulo, 04 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. Suzana C. O. M. de Sousa Disciplina de Patologia Bucal

Responsável



ANEXO B – Formulário de avaliação clínica e histológica

FICHA DE INFORMAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO

Número Laboratorial (AP):		
Nome do Paciente:		
Idade: Sexo	: Raça	ı:
Doença de base:		
Dias pós-TMO (ou data do TMO):		
Tipo da lesão:	Tempo de du	ração:
Cirurgião:	Data	::/
Telefone de contato para resultados: ()	_
Região da biópsia :		
Quais são as alterações bucais? (Chec	ar todas as alterações pro	esentes)
□ alterações liquenóides da mucosa		
□ queratose		
□ ulcerações		
\square pseudomembranas		
□ disfunção salivar		
\square sensibilidade a alimentos		
☐ dor bucal		

FICHA DE INFORMAÇÃO HISTOLÓGICA DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO DE MUCOSA ORAL

Epitélio

Epiteno				
	Normal	Atrófico	Hiperqueratose	Acantose
Espessura				
	Sim	Não		
Vacuolopatia Basal				
	Generalizada	Localizada		
Se sim				1
Apoptose/Corpos	Sim	Ocasional		
Eosinofílicos	>1/10x campo	<1/10x campo	Não	
Espongiose	Sim	Não		
Atipia de	Sim	Não		
Keratinócitos				
Exocitose	Sim	Não		
(5 linfócitos/10x campo)				
Linfócitos				
Outras células	Sim	Não		
Inflamatórias				
Espessamento da	Sim	Não	1	
lâmina basal				
		I .	1	

Lâmina Própria

Inflamação	Generalizada	Localizada
Tipo de Célula	Sim	Não
Linfócitos		
	Sim	Não
Plasmócitos		
	Sim	Não
Eosinófilos		
	Sim	Não
Neutrófilos		
	Sim	Não
Mastócitos		

Distribuição	Generalizada	Localizada
	Sim	Não
Perivascular		
	Sim	Não
Periductal(excretória)		
	Sim	Não
Intersticial		
	Sim	Não
Em banda (interface,		
submucosa, apagando a Junção)		

Glândulas (Intralobular)

	Sim	Não
Linfócitos periductais SÓMENTE		
com exocitose dentro do ducto		
	Sim	Não
Infiltrado crônico periductal misto		
	Sim	Não
Linfócitos (somente) em torno e migrando		
para dentro dos ácinos		
	Sim	Não
Células apoptóticas em ductos/ácinos		
F.,	Sim	Não
Fibrose periductal		
Degeneração acinar/ fibrose intersticial/	Sim	Não
Ectasia ductal		
Letasia ductai		
Metaplasia oncocítica (crianças)	Sim	Não
Treatpassa one serve (crianças)		
Perda da polaridade das células	Sim	Não
epiteliais do ducto		

Largura da superfície mucosa	Nº de lóbulos salivares	Nº de cortes em série,
	Menores	outras colorações

Diagnóstico final	Sem DECH	0
	Possível DECH	1
	Provável DECH	2
	DECH	3

Comentários:			

Critérios mínimos para DECH crônico de mucosa:

Alterações epiteliais (localizada ou generalizada) semelhantes àquelas descritas em DECH cutâneo e/ou presença de intralobular, linfócitos periductais (somente), e exocitose de linfócitos (somente) dentro de ácinos e ductos intralobular. Fibrose periductal (fibrose intersticial não generalizada).

ANEXO C - -Frequência diagnostica das duas escalas em estudo. (Teste exato de Fisher)

Final_Diagnosis * Horn_1995 Crosstabulation

			Horn_1995				
			1	2	3	4	Total
Final_Diagnosis	0	Count	1	0	0	0	1
		% within Final_Diagnosis	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%
	1	Count	3	13	0	0	16
		% within Final_Diagnosis	18,8%	81,2%	,0%	,0%	100,0%
	2	Count	0	10	4	1	15
		% within Final_Diagnosis	,0%	66,7%	26,7%	6,7%	100,0%
	3	Count	0	3	5	0	8
		% within Final_Diagnosis	,0%	37,5%	62,5%	,0%	100,0%
Total		Count	4	26	9	1	40
		% within Final_Diagnosis	10,0%	65,0%	22,5%	2,5%	100,0%

Análise Descritiva do número total de alterações por região. (Qui-Quadrado=100,59; p<0,0001 – Teste de Kruskal-Wallis).

	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Gland	41	4,1	1,179	4,04	2	7
Epithelium	41	7,04	2,006	7,41	1	10
Lamina Propria-Cell type	41	3,59	0,805	3,7	1	4
Cell Type-Distribution	41	2,27	0,708	2,31	1	3

Correlação "Clinical grading" versus "Horn 1995"

r	ro.	cc	ta	h

				Horn_1995			
			1	2	3	4	Total
clinical_grading	1	Count	3	20	8	0	31
		% within clinical_grading	9,7%	64,5%	25,8%	,0%	100,0%
	2	Count	1	6	1	1	9
		% within clinical_grading	11,1%	66,7%	11,1%	11,1%	100,0%
Total		Count	4	26	9	1	40
		% within clinical_grading	10,0%	65,0%	22,5%	2,5%	100,0%

Correlação "Clinical grading" versus "Final Diagnosis"

urr	osstal	

				Final_Diagnosis				
			0	1	2	3	Total	
clinical_grading	1	Count	1	12	13	5	31	
		% within clinical_grading	3,2%	38,7%	41,9%	16,1%	100,0%	
	2	Count	0	4	2	3	9	
		% within clinical_grading	,0%	44,4%	22,2%	33,3%	100,0%	
Total		Count	1	16	15	8	40	
		% within clinical_grading	2,5%	40,0%	37,5%	20,0%	100,0%	

Comparação da classificação Consenso com degeneração acinar, fibrose intersticial e ectasia ductal.

"Degeneração" versus "Consenso"

Crosstab

			0	1	2	3	Total
Degenaracao	0	Count	0	8	10	7	25
		% within Degenaracao	.0%	32.0%	40.0%	28.0%	100.0%
	1	Count	1	7	5	1	14
		% within Degenaracao	7.1%	50.0%	35.7%	7.1%	100.0%
Total		Count	1	15	15	8	39
		% within Degenaracao	2.6%	38.5%	38.5%	20.5%	100.0%

Obs: Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p=0,19).

"Fibrose" versus "Consenso"

Crosstab

				FinalDiagnosis					
			0	1	2	3	Total		
Fibrose	0	Count	0	8	13	8	29		
		% within Fibrose	.0%	27.6%	44.8%	27.6%	100.0%		
	1	Count	1	7	2	0	10		
		% within Fibrose	10.0%	70.0%	20.0%	.0%	100.0%		
Total		Count	1	15	15	8	39		
		% within Fibrose	2.6%	38.5%	38.5%	20.5%	100.0%		

Obs: Houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p=0,01).

"Ecstasia" versus "Consenso"

Crosstab

				FinalDiagnosis					
			0	1	2	3	Total		
Ecstasia	0	Count	0	12	13	5	30		
		% within Ecstasia	.0%	40.0%	43.3%	16.7%	100.0%		
	1	Count	1	3	2	3	9		
		% within Ecstasia	11.1%	33.3%	22.2%	33.3%	100.0%		
Total		Count	1	15	15	8	39		
		% within Ecstasia	2.6%	38.5%	38.5%	20.5%	100.0%		

Obs: Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p=0,22).

Comparação da classificação de Horn com degeneração acinar, fibrose intersticial e ectasia ductal.

"Degeneração" versus "Horn 1995"

Crosstab

				Horn1995				
			1	2	3	4	Total	
Degenaracao	0	Count	0	17	8	0	25	
		% within Degenaracao	.0%	68.0%	32.0%	.0%	100.0%	
	1	Count	3	9	1	1	14	
		% within Degenaracao	21.4%	64.3%	7.1%	7.1%	100.0%	
Total		Count	3	26	9	1	39	
		% within Degenaracao	7.7%	66.7%	23.1%	2.6%	100.0%	

Obs: Houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p=0,01).

"Fibrose" versus "Horn 1995"

Crosstab

				Horn1995					
			1	2	3	4	Total		
Fibrose	0	Count	0	20	8	1	29		
		% within Fibrose	.0%	69.0%	27.6%	3.4%	100.0%		
	1	Count	3	6	1	0	10		
		% within Fibrose	30.0%	60.0%	10.0%	.0%	100.0%		
Total		Count	3	26	9	1	39		
		% within Fibrose	7.7%	66.7%	23.1%	2.6%	100.0%		

Obs: Houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p=0,02).

"Ecstasia" versus "Horn 1995"

Crosstab

				Horn1995					
			1	2	3	4	Total		
Ecstasia	0	Count	0	24	5	1	30		
		% within Ecstasia	.0%	80.0%	16.7%	3.3%	100.0%		
	1	Count	3	2	4	0	9		
		% within Ecstasia	33.3%	22.2%	44.4%	.0%	100.0%		
Total		Count	3	26	9	1	39		
		% within Ecstasia	7.7%	66.7%	23.1%	2.6%	100.0%		

Obs: Houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Teste Exato de Fisher: p<0,001).