

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP

HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

MESTRADO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA
CELULAR

**Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes
com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.**

Thiago de Carvalho Reis

Ribeirão Preto

2023

Thiago de Carvalho Reis

Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de “Mestre em Ciências” do programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Prof. Dr. Leandro Dorigan de Macedo

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Reis, Thiago

Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica/ Thiago de Carvalho Reis; orientador: Leandro Dorigan de Macedo. – Ribeirão Preto, 2023.

138 f.

Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, 2023

1. Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas. 2. Doença Enxerto-Hospedeiro. 3. Citocinas. 4. Saúde Bucal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Reis, Thiago

Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de “Mestre em Ciências” do programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovado em: ___ / ___ / 2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Leandro Dorigan de Macedo

Instituição: FMRP - Hemocentro

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva

Instituição: FOP - Unicamp

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

Instituição: FOUSP -USP

Assinatura: _____

AGRADECIMIENTOS

Agradecimentos

Agradeço principalmente a Deus pela proteção, cuidado e por me ajudar a ultrapassar os obstáculos encontrados ao longo do percurso. Agradeço a toda minha família, em especial à minha esposa Danielle e minha mãe Regina, por estarem presentes em todos os momentos, dando todo suporte necessário e compreendendo minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Leandro pelas correções e ensinamentos que me permitiram evoluir, por ter desempenhado tal função com dedicação e amizade e pelos conselhos e exemplo que certamente levarei para a vida.

Aos professores da banca examinadora: Leandro, Alan Roger e Fábio pela atenção e disponibilidade concebida para participar da banca examinadora deste trabalho.

Agradeço aos colegas pesquisadores Vanessa Tonetto Marques, Mariana Andrade Costa, Maria Julia Pagliarone e Milena Vasconcelos pelo companheirismo e pelo suporte durante esta jornada.

Agradeço ao Prof. Alan Grupioni Lourenco, Gilberto André e Silva e à FORP-USP pelo auxílio nas etapas laboratoriais e pela paciência em ensinar.

Agradeço à equipe multiprofissional do serviço de transplante de medula óssea do HC FMRP-USP pelo exemplo de dedicação aos pacientes, em especial à equipe médica representada na pessoa da Dra. Thalita Cristina de Mello Costa e à equipe de enfermagem representada na pessoa das enfermeiras Ana Carolina de Jesus Vieira e Camila Campos Mesquita.

Agradeço ao Serviço de odontologia do Hospital das Clínicas, residentes e contratados por toda ajuda e apoio.

Agradeço aos pacientes que são os principais protagonistas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo financiamento desse trabalho – Código de Financiamento 001”

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ANA - Anticorpo antinuclear

Anti-dsDNA - Anticorpo anti-DNA de fita dupla

ATG - Imunoglobulina Anti-timocítica

BAFF - Fator de ativação das células B

BCR - Receptor de células B

Bregs – Linfócitos B reguladores

BSA - Albumina de soro bovino

BTK - Tirosina quinase de Bruton

CCL2 - Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C

CCR4 - Receptor de quimiocina 4

CCR5 - C-C receptor quimiocina tipo 5

CMV – Citomegalovírus

CPH – Células progenitoras hematopoiéticas

CSA - ciclosporina A

CXCR3 – Receptor 3 de quimiocinas CXC

CYPT - Ciclofosfamida pós-transplante

DECH - Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

DECHc - Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

FDA - Food and Drug Administration

HLA - Antígeno leucocitário humano

HSP60 – Chaperonina 60

HSP90 - Chaperonina 90

IBMTR - Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea

IL-1Ra - Antagonista de receptor de interleucina 1

IL1RN*2 - Alelo 2 do receptor de IL-1

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL1 β – Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina5

IL-6 – Interleucina6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23

IP-10 - Proteína 10 induzida pelo interferon

IFN α – interferon alfa

IFN γ - interferon gama

IRF - Fatores reguladores de interferon

MCP-1 - Proteína Quimioatraente de Monócitos-1

MDC - Quimiocina derivada de macrófago

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa

MMF - Micofenolato de Mofetila

MMPs - metaloproteinases de matriz

mRNA - RNA mensageiro

MTX - Metrotexato

NIH - National Institutes of Health

NLRs - Receptores NOD

NF- κ B - Fator nuclear κ B

OMRS - Oral Mucositis Rating Scale

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PSR - Registro Periodontal Simplificado

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa quantitativa

ROR γ t - Fator de transcrição receptor órfão relacionado ao ácido retinoico gama t

TARC - Quimiocina do timo regulada por ativação

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

Tc1 - Células T citotóxicas 1

Tc2 - Células T citotóxicas 2

Tc17 - Células T citotóxicas 17

sIL-2R α - Receptor α de interleucina 2 solúvel

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TCTH - Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

TGF β - Fator de crescimento transformador beta

Tfh - Células T auxiliares foliculares

Th1 - Célula T helper 1

Th2 - Célula T helper 2

Th17 - Célula T helper 17

TIMPs - Inibidores teciduais de MMPs

TLRs - Receptor Toll-Like

TNF α -Fator de crescimento tumoral alfa

Treg -Linfócito T regulador

TSLP - Linfopoiatina estromal tímica

VAS – Escala analógica visual

RESUMO

Reis, T. **Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica**. 2023. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) é uma das mais importantes complicações tardias do transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O desenvolvimento de tal condição resulta em aumento de mortalidade pós TCTH e piora na qualidade de vida dos pacientes. A literatura tem apontado para a necessidade de identificação de marcadores capazes de possibilitar o diagnóstico precoce, prever risco ou gravidade da DECHc. A utilização da saliva para análise de biomarcadores ainda é pouco relatada e pode ser uma estratégia promissora quando comparada ao plasma. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de citocinas inflamatórias no plasma e na saliva de pacientes submetidos ao TCTH que desenvolveram ou não a DECHc. Para isso, foi realizado um estudo de coorte prospectivo no qual amostras de plasma, saliva, índices de saúde bucal, medida de dor e de fluxo salivar foram coletados no pré transplante (T0), no momento do diagnóstico da DECH crônica (T1 “Grupo DECHc), ou ao completar 1 ano pós TCTH nos pacientes que não desenvolveram a doença (“Grupo T1 Não DECHc). Foram incluídos 41 pacientes, 26 do sexo masculino (63,4%) com média de 34,04 ($\pm 15,96$) anos. Destes, 13 (31%) desenvolveram DECHc. Ao comparar a quantificação de citocinas nos diferentes tipos de amostra, foi verificado que as expressões de IL-8, IL-1 β e Lactoferrina no T0, IL-8, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina no T1 foram maiores em saliva do que em plasma, ao se avaliar todos os pacientes do estudo. Os pacientes que desenvolveram DECHc apresentaram maior IL-8 e Lactoferrina na saliva; e de TNF no plasma em T0, IL-8, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina em saliva em T1. Os pacientes que não desenvolveram DECHc apresentaram maior expressão em saliva de IL-8, IL-1 β e Lactoferrina em T0, IL-8, IL-1 β e lactoferrina em T1. Entre as amostras de plasma e de saliva houve correlação significativa e positiva na expressão de IL-8, IL-1 β e IL-6 em T0, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina em T1. Ao comparar a quantificação de citocinas nos diferentes tempos do estudo (T0xT1), as amostras de plasma em T0 apresentaram maior expressão de IL-1 β e lactoferrina, do que em T1. Amostras de saliva em T0 apresentaram maior expressão de IL-8, quando comparado com T1. Nos pacientes que não desenvolveram DECHc, as amostras de plasma apresentaram maior expressão de IL-1 β no T0, na saliva a IL-1 β e IL-8 foram mais expressas em T0 do que em T1. Dentre os pacientes que desenvolveram DECHc não houve diferença significativa na expressão de citocinas inflamatórias entre T0 com T1. Os pacientes que desenvolveram DECHc apresentaram maior expressão de IL-6 em plasma e de IL-8 e IL-6 em saliva no diagnóstico da doença, quando comparado ao T1 de pacientes que não desenvolveram DECHc. Por outro lado, maior expressão de TNF- α em saliva foi observada no T0 de pacientes que não desenvolveram DECHc. Os pacientes com DECHc exclusivo em boca não apresentaram diferença na expressão de citocina, quando comparado aos pacientes sem DECHc. Pacientes com DECHc em boca e em outros órgãos apresentaram aumento sérico de IL-8, IL-1 β , IL-6 e IL-8, IL-6 salivar. O desenvolvimento de DECHc em outros órgãos (não incluindo a boca) se relacionou com aumento de IL-6 e diminuição de lactoferrina salivar.

PALAVRAS CHAVE: Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas, Doença Enxerto-Hospedeiro, Citocinas, Saúde Bucal.

ABSTRACT

Reis, T. **Evaluation of the expression of inflammatory cytokines in plasma and saliva of patients with chronic graft-versus-host disease.** 2023. Dissertation (Masters) – University of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is one of the most important late complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The development of such condition result in increased mortality after HSCT and worsens the quality of life of patients. The literature has pointed to the need to identify markers capable of enabling early diagnosis, predicting risk or severity of cGVHD. The use of saliva for biomarker analysis is still poorly reported and may be a promising strategy when compared to peripheral blood. The objective of this study was to evaluate the profile of inflammatory cytokines in the plasma and saliva of patients undergoing HSCT who did or did not develop cGVHD. For this, a prospective cohort study was carried out in which plasma, saliva, oral health indices, pain and salivary flow samples were collected pre-transplantation (T0), at the time of diagnosis of chronic GVHD (T1 “Group cGVHD), or at the end of 1 year after HSCT in patients who did not develop the disease (“Group T1 Non-cGVHD). Forty-one patients were included, 26 males (63.4%) with a mean age of 34.04 (± 15.96) years. Of these, 13 (31%) developed cGVHD. When comparing the quantification of cytokines in the different types of sample, it was verified that the expressions of IL-8, IL-1 β and Lactoferrin in T0, IL-8, IL-1 β , IL-6 and lactoferrin in T1 were higher in saliva than in plasma, when evaluating all patients in the study. Patients who developed cGVHD had higher IL-8 and Lactoferrin in their saliva; and TNF in plasma at T0, IL-8, IL-1 β , IL-6 and lactoferrin in saliva at T1. Patients who did not develop cGVHD showed higher expression in saliva of IL-8, IL-1 β and Lactoferrin at T0, IL-8, IL-1 β and lactoferrin at T1. Between plasma and saliva samples there was a significant and positive correlation in the expression of IL-8, IL-1 β and IL-6 in T0, IL-1 β , IL-6 and lactoferrin in T1. When comparing the quantification of cytokines at different times of the study (T0xT1), the plasma samples in T0 showed higher expression of IL-1 β and lactoferrin than in T1. Saliva samples at T0 showed higher expression of IL-8 when compared to T1. In patients who did not develop cGVHD, plasma samples showed higher expression of IL-1 β in T0, IL-1 β and IL-8 in saliva were more expressed in T0 than in T1. Among the patients who developed cGVHD, there was no significant difference in the expression of inflammatory cytokines between T0 and T1. Patients who developed cGVHD showed higher expression of IL-6 in plasma and IL-8 and IL-6 in saliva at the diagnosis of the disease, when compared to the T1 of patients who did not develop cGVHD. On the other hand, higher expression of TNF- α in saliva was observed in the T0 of patients who did not develop cGVHD. Patients with cGVHD exclusively in the mouth showed no difference in cytokine expression when compared to patients without cGVHD. Patients with cGVHD in the mouth and other organs showed increased serum IL-8, IL-1 β , IL-6 and IL-8, IL-6 salivary. The development of cGVHD in other organs (not including the mouth) was related to increased salivary IL-6 and decreased salivary lactoferrin.

KEYWORDS: Bone Marrow Transplantation, Graft vs Host Disease, Cytokines, Oral Health.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	20
1.1 Transplante de células tronco hematopoiéticas	20
1.1.2 Fonte de células	20
1.1.2 Tipo de doadores e compatibilidade dos transplantes	21
1.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.....	22
1.2.1 Fatores de risco	24
1.2.2 Profilaxia para DECH.....	24
1.2.3 Classificação e características clínicas.....	25
1.2.4 Tratamento.....	27
1.2.5 Fisiopatologia	29
1.2.6 Biomarcadores na Doença do enxerto contra o hospedeiro	32
1.3 Uso de amostras de saliva para pesquisa de biomarcadores	39
2.OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo Principal	41
2.2 Objetivos Secundários.....	41
3.HIPÓTESE.....	43
4.MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 – Desenho do estudo	45
4.2 – Critério de inclusão.....	45
4.3 – Critério de exclusão	45
4.4 – Variáveis de interesse e coleta de dados	46
4.4.1-Variáveis de saúde bucal.....	46
4.4.2-Variáveis de exposição.....	49
4.4.3-Variáveis secundárias.....	49
4.4.4-Variáveis de desfecho	50
4.5 – Tempos de Coleta e divisão dos grupos	51
4.5 - Quantificação de citocinas inflamatórias, lactoferrina e proteínas totais.....	52
4.6 – Análise dos resultados.....	55
5. RESULTADOS	58
5.1 Dados Demográficos	58
5.2 Classificação da DECHc.....	60
5.3 Dados de Saúde Bucal	62

5.4 Comparação e correlação da expressão de citocinas no plasma e na saliva	64
5.5 Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1	68
5.6 Comparação da expressão de citocinas em pacientes com e sem DECHc.....	72
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO.....	95
APENDICES	119
ANEXOS	127

INTRODUÇÃO E REVISÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Transplante de células tronco hematopoiéticas

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) consiste na infusão de células-tronco hematopoiéticas em pacientes com desordens medulares ou algumas doenças oncológicas e autoimunes. Esse procedimento permite o reestabelecimento de um tecido medular funcional e, dependendo da doença a ser tratada, destruir células tumorais ou gerar células funcionais que possam substituir as disfuncionais (Copelan et al., 2019; Duarte et al., 2019; Khaddour et al., 2023).

Os primeiros estudos da história do transplante de medula óssea, iniciaram-se em 1949, utilizando modelos animais (Jacobson et al., 1953). Em seres humanos, estudos clínicos usando medula óssea para restaurar a hematopoiese começaram em 1957 (Thomas et al., 1957). Desde então, o uso do transplante de células hematopoiéticas se expandiu globalmente, tornando-se um tratamento com potencial curativo para diversos distúrbios adquiridos ou hereditários do sistema hematopoiético, benignos ou malignos, incluindo os do sistema imunológico e distúrbios metabólicos (Copelan et al., 2019; Duarte et al., 2019).

O número de TCTH ao redor do mundo continua a aumentar. Em 1990, havia 143 centros transplantadores na Europa realizando 4.234 TCTH, em 2019 o número aumentou para 700 centros e 48.512 TCTH (Passweg et al., 2021). Tal expansão é justificada pelos avanços na terapia, como o surgimento de regimes de condicionamento não mieloablativos e o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras e antimicrobianas (Granot and Storb, 2020; Passweg et al., 2021) que possibilitaram ampliação nas indicações do TCTH para pacientes mais velhos, coleta de células progenitoras hematopoiéticas por via periférica e realização de transplantes não aparentados (Arai et al., 2015a; Bachier et al., 2021).

1.1.2 Fonte de células

As células-tronco hematopoiéticas usadas no TCTH podem ser obtidas a partir de três fontes: medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical. A coleta de células da medula óssea foi o primeiro método estabelecido, sendo obtidas através de procedimento realizado sob anestesia geral, por meio de punções nas cristas ilíacas do doador.

Na década de 1990, o desenvolvimento de técnica segura e eficaz para mobilização de células-tronco hematopoiéticas tornou o procedimento de obtenção de células menos dispendiosa e mais conveniente para o doador. Para a coleta a partir do sangue periférico é necessário uso prévio de medicações que estimulam a produção de células progenitoras. Tais células são liberadas na circulação periférica, colhida e separadas por meio de aférese (Balassa et al., 2019; Miller et al., 2008).

A utilização das células-tronco hematopoiéticas provenientes do sangue de cordão umbilical aconteceu com sucesso pela primeira vez em um menino de 5 anos com anemia de Fanconi em 1988 no Hospital Saint-Louis em Paris, França (Gluckman et al., 1989). Desde então, o sangue de cordão umbilical tornou-se uma fonte de enxerto disponível. Pacientes transplantados com células de cordão apresentam enxertia mais tardia, maior risco de falha de enxertia (Zhu et al., 2021) e nos últimos anos houve uma redução significativa no uso desta fonte de células (Passweg et al., 2021).

Embora as células-tronco do sangue periférico tenham se tornado mundialmente a fonte predominante de células progenitoras para o TCTH, estudos tem mostrado menor incidência doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) e melhor qualidade de vida em receptores de células provenientes da medula óssea. Por outro lado, transplantes com células de sangue periférico, podem apresentar melhores resultados clínicos devido à recuperação hematológica mais rápida, menor risco de falha do enxerto e possivelmente menor probabilidade de recidiva (Amouzegar et al., 2019).

1.1.2 Tipo de doadores e compatibilidade dos transplantes

Os dois tipos principais de TCTH são o autólogo e o alogênico. No transplante autólogo, as células-tronco são coletadas do próprio receptor e são reinfundidas posteriormente. É indicado principalmente para o mieloma múltiplo, alguns tipos de linfomas e doenças autoimunes. No transplante alogênico, as células se originam de uma pessoa diferente, podendo ser proveniente de um parente (geralmente irmãos, mãe ou pai) ou não aparentado (quando proveniente dos bancos de medula óssea). É indicado principalmente para falências medulares e leucemias (Chen et al., 2021; Duarte et al., 2019; Kanate et al., 2020).

O principal benefício do transplante autólogo é permitir o resgate medular frente à administração de terapias que resultariam em mielossupressão prolongada e maior risco de complicações. No transplante alogênico, há o benefício do efeito “enxerto versus

leucemia ou tumor”, no qual o sistema imunológico do doador contribui para a eliminação da doença subjacente (Balassa et al., 2019).

Avanços na identificação e tipagem do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) foram fundamentais para a viabilização dos TCTH alogênicos. O sistema HLA é composto por genes altamente polimórficos localizados no braço curto do cromossomo seis. Sua principal função é codificar um grupo de antígenos ou proteínas expressos na superfície das células, auxiliando o sistema imunológico a realizar a diferenciação de antígenos próprios e exógenos. As proteínas do sistema HLA estão presentes e são reconhecidas em todos os tecidos do corpo, e devido seu polimorfismo, apenas 30% dos pacientes possuem irmãos HLA idênticos. A seleção de doador para o TCTH depende de um grau adequado de compatibilidade com os antígenos HLA do receptor (Cheon et al., 2021; Kelly and Trowsdale, 2017).

Um doador HLA idêntico é definido como compatível 10/10 ou 8/8 com base na tipagem HLA de alta resolução para classe I (HLA-A, -B, -C) e II (HLADRB1, -DQB1). Apesar de milhões de doadores voluntários cadastrados nos bancos de medula óssea, pode ser um desafio encontrar um doador HLA idêntico (Gragert et al., 2014). Alternativamente, são usadas células-tronco hematopoiéticas de doadores aparentados haploidênticos, situação em que apenas um dos dois haplótipos HLA é compatível entre o receptor e o doador (Passweg et al., 2017). Outros fatores como a avaliação da alorreatividade das células *natural killers*, podem auxiliar na seleção de doadores não aparentados (Weisdorf et al., 2019).

Os TCTH podem ser classificados em idênticos e em não compatíveis. Apesar da preferência pela realização de transplantes idênticos, tem se notado um aumento dos TCTH haplodênticos aparentados. Isso ocorre devido a carência de doadores compatíveis e o desenvolvimento de protocolos de imunossupressão e depleção de células T do doador que diminuem taxas de rejeição e mortalidade, tornando essa modalidade de transplante mais segura (Arai et al., 2015a; Bleakley et al., 2015a; Im et al., 2020; Kröger et al., 2016a; Mielcarek et al., 2016; Passweg et al., 2021).

1.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) é a principal causa de morbidade e mortalidade após o transplante alogênico de células hematopoiéticas (Arai et al., 2015a; DeFilipp et al., 2021). Ocorre quando células T imunocompetentes do

doador (enxerto) se tornam reativas aos antígenos histoincompatíveis no tecido do receptor (hospedeiro) (Arai et al., 2015a; Lee et al., 2003).

A DECHc tem uma fisiopatologia complexa que resulta em inflamação crônica, fibrose, imunidade prejudicada e funcionamento alterado dos órgãos envolvidos. Múltiplos órgãos podem ser afetado, principalmente a pele, olhos, boca, pulmões, fígado, trato gastrointestinal, trato geniturinário e sistema músculo-esquelético (Jagasia et al., 2015a; Williams et al., 2021).

Alguns estudos apresentam baixas incidências da DECHc (entre 10% a 15%) (Bleakley et al., 2015b; Kröger et al., 2016b; Luznik et al., 2008; Mielcarek et al., 2016), porém a maioria dos receptores de TCTH alogênico recebem enxertos provenientes de sangue periférico e com protocolos de profilaxia para DECHc que resultam em incidências que variam entre 30% a 50% (Arai et al., 2015a; Arora et al., 2016; Im et al., 2020). Quase 50% dos pacientes adultos pós-TCTH desenvolvem a DECHc oral (Fall-Dickson et al., 2019). Outros órgãos frequentemente envolvidos são a pele, olhos, intestino e fígado (Flowers et al., 2002).

Apesar dos avanços significativos na seleção de doadores, regimes de condicionamento e protocolos de prevenção, a incidência da DECHc no primeiro ano pós TCTH continua a aumentar. Passando de 28% em 1995-1999 para 37% em 2004-2007. Tal fenômeno é explicado pela mudança do perfil dos pacientes transplantados. A idade, a eleição de doadores haploidênticos e enxertos provenientes de sangue periférico aumentaram (Arai et al., 2015b).

Há variabilidade nas taxas de mortalidade relacionadas à DECHc relatadas na literatura. Ainda assim, é consenso que esta complicação representa um dos principais fatores de risco para diminuição de sobrevida do paciente submetido ao transplante alogênico. Em uma coorte de 937 pacientes onco-hematológicos observou-se que a DECHc foi responsável por 37,8% dos óbitos não relacionados a recaída da doença (DeFilipp et al., 2021).

A morbidade causada por esta complicação também tem sido relatada na literatura. Esses estudos demonstram consistentemente que a ocorrência e a gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica são determinantes na diminuição da qualidade de vida e do estado geral de saúde, inatividade sexual e perda de emprego em sobreviventes pós TCTH alogênico. Adicionalmente, o uso de corticosteroides a longo prazo é necessário para o tratamento da DECHc e pode resultar em comprometimento da

qualidade de vida devido aos efeitos colaterais associada ao uso desta droga (Brice et al., 2021; Lee et al., 2003; Pidala et al., 2011).

1.2.1 Fatores de risco

Os fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento da DECH incluem: idade avançada do paciente, doadores do sexo feminino para receptores do sexo masculino, doadores aparentados HLA-não compatíveis e doadores não aparentados (quando comparados a doadores HLA-compatíveis aparentados), terapia com infusão de linfócitos do doador, uso de células de sangue periférico, e envolvimento prévio de DECH aguda (Flowers et al., 2011). Outros fatores de risco ainda controversos incluem soropositividade para CMV, reativação de CMV, esplenectomia, profilaxia com esteroides para DECH aguda, diferença étnica entre doador e paciente, alta contagem de células CD34 no enxerto e ausência de metotrexato no transplante de células de sangue periférico (Lee et al., 2003).

1.2.2 Profilaxia para DECH

A profilaxia para a DECH objetiva prevenir a forma aguda e crônicas da doença, ainda que se apresentem como entidades distintas. Consiste na supressão ou depleção de linfócitos e células imunológicas alorreativas. O regime ideal de profilaxia para a prevenção da DECH crônica permanece indefinido e sua escolha deve considerar a doença de base, o grau de incompatibilidade do HLA, o regime de condicionamento e as características do paciente. (Gooptu and Antin, 2021; Hamilton, 2021)

O uso de inibidor de calcineurina, geralmente em combinação com metotrexato ou micofenolato de mofetila, tem sido prática padrão nas últimas 3 décadas (Hamilton et al., 2019). Embora esses regimes possam ter benefícios na limitação da DECH aguda, eles não são eficazes na prevenção da DECH crônica (Sorrer et al., 2005). Diferentes estratégias demonstraram ser capazes de diminuir a incidência de DECH crônico, porém às custas de um atraso na reconstituição imune e do aumento na recaída da doença (Gooptu and Antin, 2021; Hamilton, 2021). Dentre elas, as de maior relevância são: a depleção de células T do enxerto, *in vitro*, assim como a depleção *in vivo* (utilizando a globulina antitimocítica de coelho, Ciclofosfamida pós-transplante, que induzem disfunção e supressão de células T alorreativas) (Gooptu and Antin, 2021; Hamilton, 2021; Wachsmuth et al., 2019). A descrição do papel de células B na biologia da DECH crônica vem dando suporte para uso de abordagens direcionadas, como ocorre no uso

profilático do Rituximab, anticorpo monoclonal direcionado ao CD20 (Cutler et al., 2013). Bloqueio da co-estimulação das células T, inibição do tráfego de células T para tecidos-alvo, inibição de citocinas inflamatórias, modificação da diferenciação de células T, entre outras, são novas estratégias para prevenir a DECH com resultados promissores em ensaios clínicos (Martinez-Cibrian et al., 2021).

1.2.3 Classificação e características clínicas

Manifestações de DECH crônica podem ser restritas a um único órgão ou podem ser generalizadas. Os sinais e sintomas variam de acordo com o órgão envolvido. A possibilidade de coexistência de manifestações da forma aguda da doença e a falta de biomarcadores (para o diagnóstico e avaliação da atividade da doença) tornam o diagnóstico e a classificação desta entidade desafiadora.

Em 2005, o National Institutes of Health (NIH) publicou um consenso com critérios para o diagnóstico da DECH (Filipovich et al., 2005). Em 2014, houve nova publicação com manutenção da estrutura proposta anteriormente e refinamentos com base em novas evidências (Jagasia et al., 2015a). Tal classificação orienta o tratamento, indica o prognóstico e tem sido amplamente utilizada em estudos (Baird et al., 2013; Inamoto et al., 2014; Jagasia et al., 2015a; Pidala et al., 2011).

Os sinais e sintomas clínicos são classificados em “diagnósticos” (manifestações que estabelecem a presença de DECH crônica sem necessidade de testes adicionais), “distintivos” (manifestações que normalmente não são consideradas suficientes para estabelecer um diagnóstico inequívoco de DECH crônica, sendo necessário testes adicionais, como uma biópsia), “Outras características ou manifestações não classificadas” (características raras, controversas ou inespecíficas de DECH crônica que não podem ser usadas para estabelecer o diagnóstico) e “comuns” (sinais e sintomas encontrados na DECH crônica e aguda). No processo diagnóstico deve-se excluir outras causas, como infecções, DECH aguda, distrofia ungueal devido a onicomiose, toxicidade de drogas, entre outros. Biópsia ou outros testes são sempre encorajados e muitas vezes valiosos para confirmar o diagnóstico, mas não são obrigatórios se o paciente tiver pelo menos um dos achados diagnósticos de DECH crônica (Jagasia et al., 2015a).

O sinal diagnóstico da DECHc oral são as alterações liquenóides, caracterizadas por linhas brancas hiperqueratóticas e lesões de aparência reticulada que podem estar presentes em qualquer localização da mucosa oral, ainda que os sítios mais acometidos

sejam a mucosa bucal e a língua. As características distintivas da DECHc incluem xerostomia, mucocele, atrofia da mucosa e úlceras. Manifestações comuns da doença, tanto na sua forma aguda quanto na crônica, incluem gengivite, mucosite, eritema e dor (Jagasia et al., 2015a). A descrição das características diagnósticas, distintivas e comuns de outros órgãos estão especificados no **anexo 1**.

A classificação de severidade da DECHc se dá por um sistema de pontuação (variando de 0 a 3), em que cada órgão/sistema possui critérios próprio. No envolvimento oral, o score 0 se refere a pacientes sem sintomas, o score 1 é dado a pacientes com sintomas leves (sem limitação significativa de ingesta), no score 2 há presença de sintomas moderados (com limitação parcial de ingesta). Pacientes com score 3 experimentam sintomas severos (com limitação importante de ingesta) (Jagasia et al., 2015a). A descrição dos critérios de severidade de cada órgão pode ser consultada no **anexo 2**.

Após a classificação individual de cada órgão/sistema, uma classificação global deve ser feita. Oito órgãos/sistemas (pele, boca, olhos, trato gastrointestinal, fígado, pulmões, articulação e fáscia e trato genital) são considerados para o cálculo. O número de órgãos envolvidos e a pontuação de severidade de cada órgão são os critérios para definir a classificação global. O **anexo 2** descreve o cálculo da gravidade global que é categorizada como leve, moderada ou grave (Jagasia et al., 2015a).

A DECHc pode surgir diretamente de um quadro de DECH aguda, de forma sequencial e ininterrupta, sendo classificada como DECHc progressiva. Essa forma da doença geralmente apresenta prognóstico desfavorável. O paciente com histórico de acometimento prévio pela doença aguda seguido de um período de resolução e que posteriormente desenvolve sua forma crônica, tem o quadro classificado como DECHc quiescente. Pacientes que desenvolvem a DECHc sem prévio acometimento pela forma aguda, tem o episódio classificado como DECHc “de novo”. Estes pacientes têm um prognóstico relativamente bom. Com base nos dados do Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (IBMTR), a distribuição de DECHc para TCTH aparentado idêntico é de 20% a 30% progressiva, 30% a 40% quiescente e 35% “de novo”. A incidência de DECHc quiescente aumenta em TCTH não aparentados (Lee et al., 2002). A presença simultânea de características de DECH aguda em pacientes com DECH crônica é classificada como “síndrome de sobreposição” e tem sido associada a pior sobrevida. (Arora et al., 2013; Filipovich et al., 2005; Jagasia et al., 2015a; Pidala et al., 2012).

1.2.4 Tratamento

O tratamento da DECH crônica destina-se a reduzir sintomas, controlando as manifestações da doença e prevenindo danos e incapacidades, sem, contudo, causar toxicidade ou danos relacionados aos próprios tratamentos. O objetivo de longo prazo do tratamento da DECHc é o desenvolvimento de tolerância imunológica, indicada pela não recorrência ou exacerbação da doença mesmo após a retirada do tratamento imunossupressor (Flowers and Martin, 2015).

A doença em sua forma leve sintomática pode ser tratada apenas com terapias locais. Pacientes com DECHc envolvendo três ou mais órgãos ou com pontuação igual ou superior a 2 em qualquer órgão, devem ter a terapia imunossupressora sistêmica considerada. O monitoramento criterioso para a detecção precoce da progressão da doença é essencial em casos tratados com terapia local. A intervenção precoce com terapia sistêmica pode prevenir a progressão para a forma grave (Jagasia et al., 2015a). Considerações que afetam a escolha do tratamento incluem os órgãos ou locais afetados, a gravidade das manifestações da doença, a presença de problemas de saúde que podem ser exacerbados pelo tratamento, possíveis interações medicamentosas, intensidade do monitoramento necessário, barreiras de acesso ao tratamento, entre outros (Flowers and Martin, 2015).

O uso de imunossupressores por pelo menos 1 ano é geralmente indicado para pacientes que atendem aos critérios para tratamento sistêmico (Flowers and Martin, 2015). Aproximadamente 50% dos pacientes são curados dentro de 7 anos após o início do tratamento sistêmico, indicado pela resolução das manifestações da doença e suspensão permanente do tratamento sistêmico. 10% requerem tratamento sistêmico por um período indefinido além de 7 anos. Os 40% restantes apresentam recaída da doença ou morrem em 7 anos durante o tratamento da DECH crônica (Vigorito et al., 2009).

O tratamento sistêmico de primeira escolha é baseado no uso de corticosteróides, iniciando com prednisona na dose de 0,5 a 1 mg/kg por dia, seguida de uma redução gradual. O tratamento prolongado com corticosteroides sistêmicos pode resultar em desfechos desfavoráveis devido sua toxicidade, como por exemplo, ganho de peso, perda óssea, miopatia, diabetes, hipertensão e aumento do risco de infecção. Por esse motivo, medicamentos poupadores de corticoide (ciclosporina ou tacrolimo) podem ser associados ao tratamento sistêmico. As estratégias para a retirada gradual da prednisona variam, mas deve-se procurar usar a dose mínima suficiente para controlar as manifestações da DECHc (Flowers and Martin, 2015).

O tratamento de segunda linha é indicado se há piora das manifestações de DECHc crônica em um órgão previamente afetado, desenvolvimento de sinais e sintomas de DECH crônica em um órgão previamente não afetado, ausência de melhora após 1 mês de tratamento de primeira linha, incapacidade de diminuir a dose de prednisona abaixo de 1 mg/kg por dia dentro de 2 meses, ou toxicidade significativa relacionada ao tratamento. Não há consenso sobre a escolha ideal do agente para o tratamento de segunda linha, de forma que são baseados na experiência do médico, acessibilidade do uso, risco de toxicidade e potencial exacerbação de comorbidade preexistente (Flowers and Martin, 2015; Sarantopoulos et al., 2019; Wolff et al., 2011). Estudos recentes apontam uma variedade de terapias custo efetivas para a DECHc refratária a corticoide, incluindo tacrolimus, sirolimus, rituximabe, ruxolitinibe, hidroxicloroquina, imatinibe, bortezomibe, ibrutinibe, fotofereze extracorpórea, nilotinibe, pomalidomida e metotrexato (Flowers and Martin, 2015; Sarantopoulos et al., 2019; Wolff et al., 2011). Recentemente o ibrutinibe foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de DECHc refratária esteroides, após demonstrar melhora clínica em aproximadamente 65% dos pacientes com DECHc oral ou cutânea (Jaglowski and Blazar, 2018; Miklos et al., 2017). Apesar da aprovação, a escolha do tratamento de segunda linha permanece baseada nos fatores acima expostos.

O uso de terapias tópicas imunossupressoras ou anti-inflamatórias e quaisquer outras intervenções direcionadas localmente, são extremamente úteis quando usadas em adição ao tratamento sistêmico. Em alguns casos seu uso pode dispensar ou permitir a redução das doses de agentes sistêmicos. Neste sentido, em 2014 foi publicado o mais recente consenso do NIH dispendo sobre as terapia auxiliares e cuidados de suporte no contexto da DECHc (Carpenter et al., 2015). No contexto da DECHc oral, as recomendações preventivas se baseiam na manutenção de boa higiene oral, limpeza dentária e radiografias de rotina, vigilância de infecções e lesões malignas. As recomendações para tratamento tópico incluem corticosteróides de média e alta potência e inibidores de calcineurina, analgésicos e terapias para xerostomia/hipossalivação (complicação comumente experimentada por pacientes com DECHc) (Carpenter et al., 2015). A indicação dos agentes tópicos, concentrações e terapias auxiliares para a DECHc oral, podem ser consultadas no **anexo 3**. As recomendações voltadas a outros órgãos/sistemas estão apresentadas no **anexo 4**.

1.2.5 Fisiopatologia

A fisiopatologia da DECH crônica é complexa e não completamente entendida. O atual modelo propôs três fases: 1- Inflamação precoce e lesão tecidual; 2- Inflamação crônica e imunidade desregulada; 3- Reparo tecidual aberrante e fibrose mediada por anticorpos. Embora esses eventos geralmente sejam sequenciais, podem ocorrer de forma independente e sobrepostos (Cooke et al., 2017; Hamilton, 2021).

Na primeira fase há dano tecidual causado pelo condicionamento, infecções e DECH aguda. Há liberação, na matriz extracelular, de produtos microbianos (devido translocação pela quebra de barreiras) e de moléculas associadas a estresse e dano celular (como o ATP, ácido úrico, RNA, DNA) (Blazar et al., 2012; Heidegger et al., 2014; Martires et al., 2011; Ramadan and Paczesny, 2015; Zeiser et al., 2011). A detecção de tais produtos pelas células apresentadoras de antígenos, através de receptores Toll-Like (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) inicia a resposta inflamatória mediada pelo sistema imune inato (She et al., 2007). Em resposta à ativação dos receptores Toll-Like os fatores reguladores de interferon (IRF) são acionados, induzindo produção de IFN α , TNF α e IL-6 através da ativação do fator nuclear kB (NF-kB) (Delaney et al., 2016; Hakim et al., 2016). A ação de citocinas inflamatórias culmina, entre outros, no recrutamento de células Th1/Tc1 e de outros fatores que aumentam o processamento e a apresentação de antígenos do hospedeiro (Choi et al., 2012). A amplificação do dano tecidual possibilita a diferenciação de Th17, processo que requer a ação de TGF β 1 e IL6, sendo potencializada na presença de IL1 β e TNF α (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Bettelli et al., 2006; Harrington et al., 2005; Wilson et al., 2007).

As células T do doador, uma vez recrutadas e ativadas no pós-transplante precoce, parecem contribuir e sustentar a DECH crônica (Brüggen et al., 2014; Rangarajan et al., 2012; Zhao et al., 2011). A participação dos linfócitos T na fisiopatologia da DECHc pode ser evidenciada pela diminuição da incidência e gravidade da doença em pacientes que passam por depleção de células T in vivo (como uso de globulina antitimocítica de coelho e ciclofosfamida pós-transplante) (Flowers et al., 2002; Luznik et al., 2012). Células T do doador, após ativadas se diferenciam em subconjuntos funcionais distintos, incluindo células Th1/Tc1, Th2/Tc2 e Th17/Tc17. Seus mecanismos efetores incluem a produção de citocinas e enzimas citolíticas que contribuem para a geração de GVHD (Brüggen et al., 2014; Dander et al., 2009; Rozmus et al., 2011)

Alteração vascular, dano e ativação das células endoteliais também tem sido relatado durante o desenvolvimento da DECH crônica. Arterite e perda extensa de

microvasos foram observadas na pele de pacientes com DECH crônica (Shulman et al., 1980). Posteriormente a perda de microvasos foi evidenciada em associadas a infiltração perivascular de linfócitos citotóxicos, perda de células endoteliais no lúmen do vaso e aumento dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand (Biedermann et al., 2002). As células endoteliais vasculares são a primeira barreira do hospedeiro a ser exposta ao sistema imunológico, sendo altamente suscetível ao ataque imunológico direto. A ativação e lesão do endotélio pode facilitar passagem de efetores celulares alóreativos do sangue para os tecidos do receptor. Adicionalmente outros estímulos inerentes ao pós TCTH precoce podem causar dano a este tipo celular, como a irradiação, lipopolissacarídeo, TNF α , além da ação de linfócitos citotóxicos (Eissner et al., 1996; Janin et al., 2002; Robaye et al., 1991).

A liberação de estímulos inflamatórios aumenta as interações entre as células apresentadoras de antígenos e as populações de linfócitos do doador, a geração de populações efetoras e reguladoras e seu recrutamento final para os tecidos-alvo.

Na segunda fase da fisiopatologia da DECHc ocorre desequilíbrio da resposta imune devido à predominância de mecanismos efetores de células alóreativas em detrimento de mecanismos reguladores (Cooke et al., 2017). O timo é o principal órgão envolvido na maturação de células T, onde células T naive (sem prévio contato com antígenos) sofrem seleção positiva e produzem células funcionais ou sofrem seleção negativa (após apresentarem forte interação a autoantígeno apresentado no timo), resultando na morte destas células altamente reativas (Klein et al., 2014). Foi demonstrado que a DECH aguda pode causar dano ao timo (Krenger et al., 2011). Adicionalmente, células epiteliais e dendríticas do timo também são alvos de linfócitos alóreativos na DECHc, potencializando a geração de mais linfócitos alóreativos pela falha na seleção negativa tímica (Wu et al., 2013). A capacidade de regeneração tímica após dano (causado por regime de condicionamento e DECH aguda) diminui com a idade, explicando o porquê da incidência de DECHc ser menor em pacientes pediátricos em comparação com adultos e idosos submetidos ao TCTH alogênico (Eapen et al., 2004).

Os linfócitos T reguladores (Tregs) também desempenham importante papel na fisiopatologia da DECHc. Eles são importantes no estabelecimento e manutenção de tolerância imunológica (Wood and Sakaguchi, 2003). Após o TCTH, a reconstituição de Tregs apresenta-se diminuída quando comparado à reconstituição de células efetoras (Alho et al., 2016). A reconstituição dos Tregs pós-TCTH depende principalmente da expansão de Tregs de memória, porém, essas células desenvolvem telômeros curtos e têm

maior suscetibilidade à apoptose (Kawano et al., 2011). Ocorre então deficiência de Treg, prejudicando a indução de imunotolerância e culminando nas manifestações clínicas da DECH crônica (Alho et al., 2016). Estratégias visando expansão *in vivo* e *in vitro* de Treg tem mostrado potencial para prevenção da doença em sua forma crônica e aguda (Hannon et al., 2014; Theil et al., 2015). Entretanto, alguns trabalhos tem reportado número aumentado de Tregs em pacientes com DECHc (Clark et al., 2004; Mizukami et al., 2008).

As células B e a produção de autoanticorpos parecem desempenhar um papel fundamental em alguns tipos de DECH crônica. Em um cenário fisiológico, células B auto reativas são deletadas por apoptose, na medula óssea (Cambier et al., 2007). Isso não ocorre em pacientes com DECHc que desenvolvem anticorpos contra antígenos do complexo de histocompatibilidade menor no pós TCTH alogênico (Miklos et al., 2005). A produção frequente de autoanticorpos em pacientes com DECHc sugere que a perda de tolerância imunológica de células B é operacional (Patriarca et al., 2006). A sinalização através do receptor de células B (BCR) e do fator de ativação de células B (BAFF) tem papel chave na sobrevivência e maturação de células B e determinam seu potencial autorreativo (Allen et al., 2014, 2012). Tais mecanismos são alvos terapêuticos estudados, a exemplo do Ibrutinibe, recém aprovado pela FDA para tratamento da DECHc, que consiste em um inibidor seletivo e irreversível da proteína tirosina quinase de Bruton (BTK) inibindo a transdução de sinal do BCR e bloqueando a ativação das células B (Jaglowski and Blazar, 2018). Outros mecanismos podem contribuir para a função aberrante das células B, seja pela falta de supressão relacionada à deficiência de células B reguladoras (Bregs), seja pela ativação de linfócitos B causada pelo aumento de função de células T auxiliares foliculares (Tfh). (Forcade et al., 2016; Khoder et al., 2014; Le Huu et al., 2013)

A terceira fase desta complexa fisiopatologia envolve reparo tecidual anormal e propagação de fibrose. O sistema imunológico desempenha um papel central na regulação da inflamação e reparação tecidual. A formação de fibrose patológica resulta de infecção crônica, ativação imune persistente e/ou respostas regenerativas prejudicadas. As células mieloides (monócitos, macrófagos e neutrófilos) envolvidas na resposta inflamatória da DECHc secretam fatores solúveis (TNF α , IL-1 β e IL-6) importantes condutores de fibrose.

Os macrófagos teciduais também são reguladores da fibrose e uma importante fonte de TGF β (talvez a molécula mais significativa envolvida na fibrinogênese), fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF), metaloproteinases de matriz (MMPs), bem como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (Van Linthout et al., 2014; Wynn and Barron, 2010). Os macrófagos sofrem diferenciação, podendo apresentar o fenótipo M1, também chamados de macrófagos ativados classicamente (com capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α e IL-1 β , ativando fibroblastos e contribuindo para geração de fibrose) e M2, também chamados de macrófagos ativados alternativamente (com capacidade de regular a inflamação e contribuir para processos pró e anti-fibróticos) (Gordon and Taylor, 2005; Wynn and Ramalingam, 2012). Tem sido relatado na literatura um desequilíbrio na função dos macrófagos M1/M2 e sua participação no dano à órgãos com manifestações fibroticas afetados pela DECHc (Alexander et al., 2014; Cooke et al., 2017).

O recrutamento de células Th2 e Th17 também promove fibrose principalmente pela secreção de IL-13 e IL-17, respectivamente. O papel de Th1 e a secreção de IFN γ é controverso, mostrando efeitos pró-fibróticos e anti-fibróticos (Cooke et al., 2017).

Vários sistemas experimentais revelaram um papel das células B no desenvolvimento da fibrose que caracteriza algumas formas de DECH crônica. É relatado o papel de linfócitos T auxiliares foliculares (Thf) no aumento da formação de centros germinativos de células B em tecidos linfoides secundários. Tal fenômeno se correlaciona com o desenvolvimento da DECHc e bronqueolite obliterante (caracterizada pela presença de fibrose peribronquiolar e intersticial dos bronquíolos terminais, sinal patognomônico na DECHc de pulmão) (Flynn et al., 2014). Fibrose decorrente da DECHc no pulmão e no fígado foi associada à presença de células T, infiltração de células B e deposição de aloanticorpos. No mesmo estudo, modelos murinos incapazes de produzir aloanticorpos IgG apresentaram diminuição do acometimento pela bronqueolite obliterante e DECHc, mostrando o papel de aloanticorpos no reparo tecidual anormal (Srinivasan et al., 2012).

Linfócitos Tregs suprimem a resposta inflamatória causada por linfócitos Th2 e Th17, porém, por meio da secreção de TGF- β 1 estimula a síntese de componentes da matriz extracelular por fibroblastos, culminando em deposição de colágeno, fibrose e disfunção do órgão-alvo.(Kitani et al., 2003).

1.2.6 Biomarcadores na Doença do enxerto contra o hospedeiro

Biomarcadores são características objetivas medidas e avaliadas com um indicador de processo biológico ou patogênico. Suas aplicações no contexto da DECHc

incluem: a) diagnóstico e avaliação da atividade da doença, b) prognóstico, sendo útil para identificar pacientes com diferentes graus de risco para ocorrência, progressão ou resolução da DECH, c) predição, fornecendo previsões sobre como o paciente poderá responder à certa intervenção ou tratamento, e d) indicador de resposta ao tratamento, ajudando a monitorar a evolução/resolução da doença após o início do tratamento. A disponibilidade de biomarcadores para DECHc pode potencialmente refinar o diagnóstico, estimar o risco de desenvolver DECHc ou prever a resposta à terapia, de forma complementar aos critérios clínicos e histológicos (Paczesny et al., 2015). Eles são geralmente obtidos por meio de correlações. A reconstituição imune pós TCTH, presença de DECHa concomitante, terapia imunossupressora e vigência de infecções são variáveis confundidoras e, portanto, devem ser controladas.

Diversos marcadores para a DECHc têm sido investigados na literatura, incluindo a avaliação polimorfismos genéticos, tipos celulares e mediadores inflamatórios, dentre eles, as citocinas inflamatórias, objeto central do presente trabalho.

1.2.6.1 Polimorfismos genéticos

Diversos polimorfismos em genes que regulam a expressão de citocinas inflamatórias têm sido associados a um maior risco de desenvolvimento de DECHc. A família IL-1 está amplamente envolvida em processos inflamatórios. IL-1 α e IL-1 β e o antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), medeiam imunidade e inflamação na DECHc. Diversos trabalhos encontraram polimorfismo associados a IL-1 α e IL-1 β predispondo a um maior risco de desenvolvimento de DECHc (Cullup et al., 2003; Hyvärinen et al., 2017; Martínez-Laperche et al., 2018). Polimorfismo no alelo 2 do receptor de IL-1 (IL1RN*2) foi associado a um aumento de produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Hurme and Santtila, 1998). A contribuição do IL-1 para a resposta pró-inflamatória depende do equilíbrio entre essas moléculas. A presença de IL1RN*2 contribuiu para aumento de risco de desenvolvimento de DECHc extensiva (com envolvimento de pelo menos 2 órgãos) em uma coorte de 64 pacientes submetidos ao TCTH (Bertinetto et al., 2006). Kohrt e colaboradores constataram um perfil genético nos pacientes que desenvolveram DECHc compatível com uma maior expressão do receptor tipo II de IL-1 (IL-1R2), o qual inibe a superativação de IL1. Os autores concluíram se tratar de uma resposta de atenuação adquirida na presença da doença (Kohrt et al., 2013)

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória que tem um papel central na patogênese da DECH. Sua liberação durante o regime de condicionamento está envolvida na ativação de células apresentadoras de antígenos, danos apoptóticos de tecidos-alvo, indução da ativação de células T. Polimorfismos associados a esta citocina também tem sido associadas com o desenvolvimento e gravidade de DECHc (Bertinetto et al., 2006; Mullighan et al., 2004; Stark et al., 2003; Viel et al., 2007).

A IL-6 pode ser produzida pela maioria das células, principalmente por monócitos e macrófagos. A sinalização clássica de IL-6 resulta na fosforilação de STAT3, que é crítica para o desenvolvimento de cGVHD (Flynn et al., 2016). Até o momento, polimorfismos no promotor da interleucina 6 na posição -174 parece ser um fator de risco robustos aumentando o risco de desenvolvimento da DECH tanto aguda quanto crônica. No contexto da DECHc, diversos trabalhos têm relatado tal associação, inclusive no aumento de risco de desenvolvimento de formas mais graves da doença. (Cavet et al., 2001; Cullup et al., 2003; Dickinson et al., 2004; Laguila Visentainer et al., 2005; Mullighan et al., 2004; Stark et al., 2003).

Polimorfismos associados a outras citocinas inflamatórias (INF- γ , IL-2, , IL-17) e anti-inflamatórias (o INF- γ , TGF β , IL-10) também tem sido observadas (Bogunia-Kubik et al., 2005; Kim et al., 2005; Martínez-Laperche et al., 2018; Mullighan et al., 2004).

1.2.6.2 Mediadores inflamatórios em amostras de sangue periférico

Em uma série de casos, a avaliação de mediadores inflamatórios procedeu-se a partir da expressão de mRNA através da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR). Foram coletadas amostras de sangue periférico de 6 pacientes com DECHc oral e de 2 pacientes submetidos ao TCTH porém sem DECH. No momento da coleta dois pacientes com DECHc oral apresentavam lesões (DECHc ativa) e quatro pacientes apresentavam a mucosa oral completamente cicatrizada (DECHc inativa). Informações sobre o tratamento e classificação da DECH não foram especificadas. Os níveis de expressão gênica no grupo com DECHc oral estavam aumentados em comparação com aqueles sem DECH. As amostras do grupo com DECHc oral expressou consistentemente mais IFN- γ , TNF, IL-1 β , ligante de quimiocina 2 (CCL2) e expressão de genes que codificam as proteínas HSP60 e HSP90 (Chaperonina 60 e 90). A expressão gênica de IFN- γ , TNF, IL-1 β e CCL2 foram mais notáveis com aumento de 100 vezes em média (Pinto et al., 2022).

Hayashida e colaboradores também avaliaram a expressão sérica de mRNA em 16 pacientes com DECHc oral comparando com 10 pacientes controles não submetidos ao TCTH. Os pacientes com DECHc apresentavam biópsias confirmatórias e envolvimento de mais dois órgãos entre pele, fígado e olhos. Dados relacionados ao tratamento não foram especificados. Apenas IFN- γ , IL-4 e IL-5 foram mais fortemente expressos nos pacientes com DECHc quando comparado ao grupo controle. Análises nas biópsias de mucosa oral e glândula salivar apresentaram expressão aumentada de mRNA de IL-2, IFN- γ , proteína 10 induzida pelo interferon (IP-10), receptores de quimiocina CXCR3 e CCR5, IL-4, IL-5, quimiocina do timo regulada por ativação (TARC), quimiocina derivada de macrófago (MDC), receptor de quimiocina 4 (CCR4) e IL-10, quando comparados aos controles. A expressão de tais mediadores no tecido foram significativamente maiores quando comparados à amostras de sangue periférico (Hayashida et al., 2013).

Dentre os trabalhos que quantificaram a presença de citocinas solúveis em sangue periférico, o único que avaliou a DECHc oral foi o publicado por Yong e colaboradores. Trata-se de um estudo transversal incluindo 16 pacientes com DECHc oral e em mais outro órgão (grupo OcG/ScG), 26 pacientes com DECHc oral sem envolvimento de outro órgão (grupo OcG), 9 pacientes com DECHc sem envolvimento oral (grupo ScG) e 39 pacientes sem DECHc. O quantificação de citocinas séricas foi realizada por citometria de fluxo (Cytometric bead assay - CBA, BD Biosciences, USA) e ELISA. As amostras de sangue periférico dos pacientes com algum envolvimento de DECHc, apresentaram elevação de IL-4, IL-23 e diminuição de TGF- β quando comparados ao grupo sem DECHc. Os níveis de IL-6 e IL-10 no soro foram maiores apenas em pacientes com DECHc oral e se correlacionaram com a gravidade da doença. A análise de regressão logística revelou que alto nível sérico de IL-23 e baixo nível sérico de TGF- β se associam à ocorrência de DECHc oral. Neste mesmo trabalho foram realizadas avaliações em amostras de saliva, porém estas serão descritas posteriormente (Yong et al., 2021).

Outros trabalhos têm comparado pacientes que desenvolveram DECHc, sem foco no acometimento oral. Destaca-se o relato do aumento sérico de TNF- α em pacientes que apresentaram predominantemente a DECHc com envolvimento extensivo. Tal elevação foi observada no terceiro, quarto, quinto e sexto mês pós TCTH. Neste estudo, o tempo médio para o desenvolvimento da DECHc foi 6 meses pós TCTH. O mesmo trabalho também evidenciou diminuição dos níveis de IFN- γ no terceiro mês e aumento de IL-10 no quarto mês (Skert et al., 2009).

Li e colaboradores avaliaram 56 pacientes divididos em 3 grupos (pacientes sem DECH, pacientes com DECH crônica e pacientes com DECH aguda) além de um grupo de 24 pacientes saudáveis. Os achados incluem níveis de TNF- α marcadamente elevados em pacientes com DECH crônica e DECH aguda quando comparado aos controles saudáveis e ao grupo sem DECH. Neste trabalho os níveis de IL-2 e IL-10 se encontravam abaixo do limite de detecção na maioria dos pacientes (Li et al., 2010).

Da mesma forma, Dander e colaboradores, evidenciaram um aumento de TNF- α , IL-6 e IL-8 em pacientes com DECH crônica e DECH aguda, em comparação com pacientes saudáveis ou com DECH inativa (Dander et al., 2009).

Em seu estudo, Barak e colaboradores observaram que os três pacientes que apresentavam níveis indetectáveis de TNF- α desenvolveram DECHc leve ($n = 3$), enquanto os pacientes que apresentavam níveis altos ou extremamente altos de TNF apresentavam DECHc moderada a grave ($n = 10$). Adicionalmente, todos os pacientes com DECHc moderado ou grave apresentaram níveis muito elevados de IL-6. Observaram também maiores níveis de IL-1 β em 11 de 13 pacientes com DECHc quando em comparação com os pacientes controles. 2 de 3 pacientes com DECHc leve apresentaram baixos níveis de IL-1 β , já o terceiro apresentou níveis elevados. A maioria (8/12) dos pacientes tinham níveis indetectáveis ou baixos de IFN- γ . Os níveis de IL-2 foram indetectáveis em todos os pacientes (Barak et al., 1995).

Maiores níveis séricos de IL-6 tem sido reportados em pacientes com DECHc (Barak et al., 1995; Dander et al., 2009; Fujii et al., 2008; Wang et al., 2011; Yong et al., 2021). Wang e colaboradores incluíram em sua coorte 20 doadores saudáveis e 39 pacientes transplantados, dos quais 10 pacientes desenvolveram DECH aguda, 13 DECHc e 16 pacientes não apresentaram evidência de DECH. A comparação entre os grupos mostrou que os níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-17 e IL-23 aumentaram significativamente em pacientes com DECHa e DECHc em comparação com os pacientes sem sinais clínicos de DECH e doadores saudáveis. IL-10 e TGF- β apresentavam-se em menores níveis. Após o tratamento da DECH, os níveis plasmáticos de IL-6, IL-17 e IL-23 diminuíram, IL-10 e TGF- β aumentaram e os níveis de IFN- γ e IL-4 não se alteraram significativamente (Wang et al., 2011).

Uma coorte longitudinal acompanhou 52 pacientes recém diagnosticados com DECHc extensiva e 28 pacientes transplantados sem DECH. Coletas de sangue periférico foram realizadas precocemente (3 a 8 meses pós TCTH) e tardiamente (9 meses pós TCTH). Os pacientes foram pareados quanto ao tempo pós TCTH. Apesar de não haver

diferença estatística na quantificação de IL-6 entre as coletas precoces e tardias, níveis de IL-6 foram significativamente maiores em pacientes com DECH articular. Nenhum dos marcadores avaliados (sIL-2R α , MCP-1, IL-6 sBAFF, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF- β , IFN- α , autoanticorpos: ANA, anti-dsDNA, antimitocondriais e anticardiolipina) foi associado ao envolvimento oral, esofágico ou outras partes do trato gastrointestinal (Fujii et al., 2008).

Outras citocinas encontradas nesta revisão relacionadas à DECHc incluem: IL-4, IL-5 (Hayashida et al., 2013), IL-17 (Dander et al., 2009; Wang et al., 2011), IL-10 (Wang et al., 2011), IFN- γ (Hayashida et al., 2013; Wang et al., 2011) e IL-15 (Pratt et al., 2013).

1.2.6.3 Mediadores inflamatórios em amostras de saliva

Poucos trabalhos têm avaliado biomarcadores para a DECHc em amostras de saliva. A que sabemos, apenas 4 trabalhos foram publicados e seus achados e particularidades serão descritos adiante (Bassim et al., 2012; Devic et al., 2014; Fall-Dickson et al., 2010; Yong et al., 2021). Em um estudo transversal, Yong avaliou amostras de sangue periférico e saliva (não estimulada) de 90 pacientes. Os pacientes foram separados em grupos de acordo com a localização dos órgãos envolvidos pela DECHc (boca exclusivo, boca mais outro órgão ou outro órgão sem acometimento oral). Pacientes sem DECHc e submetidos ao TCTH alogênico foram incluídos como controle. Níveis de IFN- γ , IL-12, IL -4, IL -6, IL -10, IL -17 de todos os grupos foram detectados nos dois tipos de amostra, através de citometria de fluxo (Cytometric bead assay - CBA, BD Biosciences, USA). Os níveis de IL-23 e TGF- β foram medidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, BD Biosciences, EUA). Tanto no soro quanto na saliva, os níveis de IL-6 e IL-10 foram maiores apenas em pacientes com DECHc com envolvimento oral. Pacientes com DECHc sem envolvimento oral apresentaram um aumento dos níveis de IL-4 e IL-23 séricos, além de diminuição de TGF- β sérico. Entre os pacientes que desenvolveram alguma manifestação oral da DECHc (seja exclusiva ou associada a outro órgão), a gravidade da manifestação foi correlacionada positivamente com IL-6 salivar e sérico, IL-10 salivar e sérico e IL-23 somente sérico. Correlação negativa ocorreu com o nível sérico de TGF- β (Yong et al., 2021).

Fall-Dickson e colaboradores realizaram um estudo transversal avaliando 42 pacientes com DECHc oral, dentre os quais 47% apresentaram a forma moderada e 50% a forma grave da doença. O estudo informou que os pacientes incluídos apresentavam uma mediana de 11 meses pós diagnóstico (1-196 meses). Aproximadamente dois terços

da amostra estavam recebendo níveis moderados ou altos de imunossupressão sistêmica. Foram obtidas coletas de saliva estimulada com ácido cítrico 2%. A sucção salivar foi realizada na região submandibular/sublingual tanto nos pacientes com DECHc oral quanto nos voluntários saudáveis. As características clínicas da DECHc oral (eritema, atrofia, hiperqueratose, alterações liquenoides e edema) foram pontuadas de acordo com o “Oral Mucositis Rating Scale” (OMRS) de 0 a 3 em cada região (0 = normal/sem alteração; 1 = alteração leve; 2 = alteração moderada; 3 = alteração severa). A extensão da ulceração/pseudomembrana também foi pontuada (0 = ausente; 1 = entre 0 e 1cm²; 2 = entre 1 e 2cm²; 3 = maior que 2cm²). As concentrações salivares de IL1 α e IL6 foram medidas por ensaio ELISA. A concentração de IL-1 α e IL-6 estavam significativamente aumentadas no grupo de estudo em comparação com pacientes saudáveis. IL-6 teve uma fraca associação positiva com a OMRS ($r = 0,49$; $p < 0,01$), uma associação positiva moderada com a presença de eritema ($r = 0,63$, $p < 0,01$), e uma tendência positiva foi observada com a presença de ulceração oral ($r = 0,01$). 38; $p = 0,04$). A intensidade da xerostomia foi auto-relatada por meio de uma escala de classificação numérica e associou-se fracamente com o aumento na quantificação de IL1 α saliva ($r = 0,41$; $p = 0,04$) (Fall-Dickson et al., 2010).

Bassim e colaboradores, em um estudo transversal retrospectivo, avaliaram o perfil de proteínas salivares através da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas. As coletas de saliva não estimulada foram realizadas em 5 pacientes com DECHc oral moderada a severa e em 5 pacientes controles com DECHc em outros órgãos. O tempo pós TCTH de cada grupo foi em média 1396 (± 1345) e 592 (± 582) dias respectivamente e ambos os grupos estavam sob imunossupressão leve a moderada. Como resultados, foram identificadas 180 proteínas salivares. Destas, 102 variaram significativamente, incluindo 12 proteínas identificadas apenas no grupo sem DECHc oral. A redução nos níveis salivares dos pacientes com DECHc oral foi confirmada para a lactotransferrina, lactoperoxidase e diversas cistatinas (Cistatina-SA, cistatina-C, cistatina-B, cistatina-S e cistatina-D). Nenhuma diferença significativa foi observada na quantificação de proteínas totais em ambos os grupos (Bassim et al., 2012).

Um estudo semelhante realizou análise proteômica quantitativa de um pool de saliva de pacientes com e sem DECHc oral. 83% dos pacientes com DECHc oral possuíam envolvimento de outros órgãos. Na primeira fase do estudo foi realizada uma análise exploratória com espectrometria de massas que permitiu identificar 249 proteínas salivares dentre as quais 82 exibiram expressão alterada no grupo com DECHc oral. A

Lactoperoxidase salivar e lactotransferrina se apresentavam aumentadas no grupo com DECHc oral em comparação com o grupo sem DECHc oral. Adicionalmente apresentava-se diminuída a quantificação da proteína antagonista do receptor de IL-1. Posteriormente as proteínas foram escolhidas para validação como potenciais biomarcadores orais de DECHc. Após a quantificação por ELISA das proteínas selecionadas, os autores verificaram que a diminuição de cistatina B associada à diminuição da proteína antagonista do receptor de IL-1 foram capazes de distinguir a DECHc oral com sensibilidade de 85% e especificidade de 60%.

1.3 Uso de amostras de saliva para pesquisa de biomarcadores

Existem muitas vantagens em usar a saliva como um biofluido para pesquisa de biomarcadores. Sua coleta é rápida, fácil, barata, não invasiva, permitindo a coleta pelo próprio paciente e em ambiente domiciliar. É fácil de armazenar, transportar e não coagula. Para os profissionais de saúde envolvidos nas coletas, o uso da saliva evita o risco de lesões percutâneas e auto-contágio (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017). Nas últimas décadas, um fator limitante para o uso da saliva como ferramenta clínica foi a falta de tecnologia adequada e custo-efetiva (Giannobile et al., 2011). No entanto, publicações recentes mostram que esse obstáculo será removido em breve (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017). Adicionalmente, sua composição pode refletir o estado fisiológico atual de um indivíduo e portanto tem potencial para ser usada para a detecção de biomarcadores essenciais para doenças bucais (como a periodontite, cancer bucal, entre outros) e sistêmicas (como doenças autoimunes, endocrinológicas, entre outras). (Castro et al., 2003; Cheng et al., 2014; Knight et al., 2016; Lakshmi et al., 2015; Riega-Torres et al., 2016).

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias em plasma e saliva de pacientes submetidos ao TCTH alogênico, com e sem DECHc.

2.2 Objetivos Secundários

2.2.1- Comparar e correlacionar a expressão de IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e lactoferrina entre plasma e saliva de pacientes submetidos ao TCTH alogênico no pré e pós transplante;

2.2.2- Comparar a expressão das citocinas inflamatórias entre os pacientes com e sem DECHc tanto em plasma, quanto em saliva;

ΗΠΟΤΕΣΕ

3.HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é de que haja aumento de expressão das citocinas inflamatórias avaliadas tanto no plasma, quando na saliva dos pacientes com DECHc. Hipotetiza-se que no envolvimento oral haja maior expressão de citocinas em saliva.

MATERIAL E MÉTODOS

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Desenho do estudo

Estudo transversal, prospectivo, observacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (56741322.4.0000.5440, **Anexo 5**) que incluiu 41 pacientes submetidos ao primeiro transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, avaliados nos seguintes tempos: 1. Antes do início do condicionamento (T0); 2. No diagnóstico de DECHc (T1-DECHc) e 3. Após um ano de transplante para os que não desenvolveram DECHc (T1-Não DECHc). As avaliações e coletas de amostras foram realizadas entre janeiro de 2019 a dezembro de 2022 na enfermaria e no ambulatório multiprofissional de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. As avaliações no pré transplante (T0) foram realizadas após a internação do paciente e antes do início do condicionamento. Os dados provenientes de avaliação clínica e os coletados de prontuário eram registrados em ficha individual. (**Apêndice 1**)

Todos os dados envolvendo seres humanos cumprem os princípios orientadores encontrados na Declaração de Helsinque e antes da inclusão no estudo, os pacientes foram informados sobre o trabalho, riscos e benefícios. O termo de consentimento foi assinado, em caso de concordância (**Apêndice 2**).

4.2 – Critério de inclusão

Pacientes submetidos ao primeiro transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.

4.3 – Critério de exclusão

Pacientes com recaída da doença durante o período de estudo, pacientes que iniciaram tratamento imunossupressor sistêmico para DECHc antes das coletas de sangue e saliva, pacientes com quadro de overlap conforme os critérios estabelecidos pelo consenso do NIH em 2015 (Jagasia et al., 2015b), infecções no período das coletas e pacientes com alterações neurológicas ou psicomotoras que dificultassem o autocuidado e a realização das coletas.

4.4 – Variáveis de interesse e coleta de dados

As variáveis foram divididas em quatro categorias: 1. Variáveis de saúde Bucal: Condições bucais que direta ou indiretamente pudessem interferir na ocorrência de DECHc (Índices de saúde bucal, fluxo salivar); 2. Variáveis de exposição: desenvolvimento ou não de DECHc; 3. Variáveis Secundárias: fatores de risco para o desenvolvimento de DECHc (Idade, sexo, regime de condicionamento, tipo de doador, compatibilidade HLA entre doador e receptor, fonte de células, gênero doador/recepto, doença de base). 4. Variáveis-desfechos: citocinas (IL-8, IL-1 β , TNF α , IL-6 e lactoferrina) em plasma e saliva.

4.4.1-Variáveis de saúde bucal

1.CPO-D:

O CPO-D consiste em um índice formulado em 1937 por Klein e Palmer e ainda hoje é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para mensurar e avaliar a experiência de cárie dentária em grupos de indivíduos (World Health Organization, 2013). Este índice é validado pela OMS e utilizado em levantamentos epidemiológicos no Brasil e ao redor do mundo. Cada dente recebe um código, podendo ser: Hígido (0), Cariado (C), perdido ou extraídos (P) e obturados ou tratados/restaurados (O). Os critérios para cada código estão resumidos no **quadro 1**. Foi convencionado a não contabilização dos terceiros molares, logo a pontuação de cada indivíduo variou de 0 a 28. O dente foi considerado presente na boca quando qualquer parte dele estava visível. O exame clínico para coleta do índice foi realizado de forma sistematizada seguindo a sequência de avaliação iniciando do dente 18 ao 11, 21 ao 28, 38 ao 31, 41 ao 48. Ao final da avaliação, os dentes cariados, perdidos e obturados foram somados. Por exemplo, um paciente com 2 dentes cariados, 1 perdido, 1 restaurado e os demais hígidos, teve um CPO-D com pontuação 4.

Quadro 1- Descrição dos códigos do Índice de dentes perdidos, cariados e obturados (CPO-D)

Código	Descrição
Dente Hígido (código 0)	Dentes sem cavitação cariosa ou tecido amolecido, podendo apresentar sulcos ou fissuras do esmalte pigmentados, manchamentos dentários, fluorose (leve a severa), lesões de abrasão e abfração.
Dente cariado (código C)	Dente com cavidade evidente e tecido amolecidos detectável, presença de restauração temporária, carie crônica cavitada mesmo sem necessidade de tratamento, dentes restaurado e com caries/infiltrações. Fraturas traumáticas não foram consideradas nesta ponuação. Em caso de dúvidas, a cárie não foi ser registrada como presente
Dente perdido (P)	Dentes extraídos ou com extração indcada devido destruição por carie
Dente obturados (O)	Presença de restaurações permanentes satisfatórias, presença de coroas devido a cárie progressa. Selantes não são considerados restaurações

2.PSR:

O Periodontal Screening and Recording (PSR) ou Registro Periodontal Simplificado, foi desenvolvido em 1992 pela American Dental Association juntamente com a American Academy of Periodontology a fim de facilitar a identificação precoce da doença periodontal. O referido índice tem sido amplamente usado em diversos trabalhos e tem mostrado ser capaz de refletir as características clínicas da doença periodontal e necessidade de tratamento (Dourado and Rapp, 2004; Rams and Loesche, 2017).

Para tal avaliação utiliza-se uma sonda com uma esfera de 0,5 mm de diâmetro em sua extremidade e uma faixa colorida entre as medidas de 3,5 mm e 5,5 mm. Percorre-se o sulco gengival de todos os dentes com a sonda em uma posição paralela ao longo eixo de todos os dentes. É registrada a pior condição do sextante. Bolsas periodontais não são registradas em indivíduos menores de 15 anos de idade (World Health Organization, 2013). O quadro 2 mostra os critérios para cada escore (J Charles and H Charles, 1994).

Quadro 2 – Critérios para definição de escores do PSR

Escore	Critérios PSR
0	Nenhum sinal de doença periodontal - Faixa colorida totalmente visível
1	Sangramento gengival até 30s após a sondagem suave - faixa colorida totalmente visível
2	Cálculo supra e/ou subgengival e/ou margens restauradoras mal adaptadas - faixa colorida totalmente visível
3	Bolsa periodontal que permite a introdução da sonda no sulco (bolsa de 4 a 5 mm) – faixa colorida da sonda parcialmente visível
4	Bolsa periodontal que permite maior introdução da sonda no sulco (bolsa profunda de 6 mm ou mais) - faixa colorida não visível
*	Anormalidade clínica associada aos demais escores - comprometimento de furca, mobilidade, alterações mucogengivais e/ou recessão gengival na área colorida da sonda (maior que 3,5 mm a partir da junção amelocementária).

Adicionalmente, foram registrados o número de sextantes de cada indivíduo com pontuação 3 e 4 no PSR. Ao final do estudo a porcentagem de sextantes registrados foi calculado em relação ao número total de sextantes avaliados.

3.Índice de placa:

O índice de placa utilizado foi o proposto por Silness e Løe (Løe, 1967) que mensura a presença de biofilme na superfície dos dentes índices 16, 12, 24, 36, 32 e 44 (Silness and Loe, 1964). A partir da análise são atribuídos os seguintes scores: 0 – Ausência de placa na área gengival da superfície dental quando se passa a sonda periodontal; 1- A placa somente pode ser reconhecida passando-se a sonda sobre a superfície do dente (não visível a olho nu); 2- Moderado acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival e/ou superfície dental adjacente (visível a olho nu); 3- Abundante acúmulo de depósitos moles dentro do sulco gengival, na margem gengival e/ou na superfície dental adjacente. Cada uma das 4 faces dentais recebe uma pontuação. O índice global foi calculado somando os scores de cada face e dividindo pelo número de faces avaliadas. É considerado higiene oral satisfatória os pacientes com índices finais 0 a 1, enquanto os pacientes com índice 1,1 a 3 são classificados como higiene oral insatisfatória (Løe, 1967)

4.Fluxo salivar:

Foi realizada coleta de saliva não estimulada. O paciente foi orientado a não se alimentar e não escovar os dentes pelo menos por 1 hora antes da coleta, a bochechar e cuspir água imediatamente antes da coleta de saliva. Para a coleta, foi solicitado ao paciente a acumular saliva e cuspir em frasco plástico descartável pré-pesado a cada 60 segundos até completar 5 minutos. Após o término do tempo estimado, os frascos foram novamente pesados utilizando Balança Digital (Sf-400 Alta Precisão Eletrônica 1g a 10 Kg) para determinação do peso do conteúdo coletado. Considerou-se a densidade da saliva = 1g/ ml e procedeu-se à conversão do peso da amostra para volume. O volume coletado foi dividido por 5 (conforme a duração do teste) e a medida em ml/minuto foi registrada na ficha individual de coleta (**Apêndice 1**).

4.4.2-Variáveis de exposição

1.Diagnóstico da Doença do enxerto contra o hospedeiro:

O diagnóstico da Doença do Enxerto contra o hospedeiro foi realizado de acordo com os parâmetros publicados pelo consenso do National Institutes of Health (NIH) (Jagasia et al., 2015a). Os pacientes com sinais e sintomas suspeitos de DECH passavam por avaliação multiprofissional para diagnóstico, classificação e proposição de tratamento.

O diagnóstico era realizado na presença de um sinal diagnóstico para DECH crônica ou sinal distintivo com posterior confirmação com exames complementares confirmatórios. Outras causas eram descartadas (como infecções, DECH aguda, e toxicidade medicamentosa). Cada órgão e sistema era pontuado de acordo com a severidade da doença em cada órgão. O número de órgãos envolvidos e a pontuação de severidade de cada órgão foram os critérios utilizados para realizar a classificação global da doença (Jagasia et al., 2015a). A descrição dos critérios para classificação da severidade da DECHc e para o cálculo da gravidade global estão apresentados no **anexo 2**. Após o diagnóstico, os episódios eram classificados em DECHc progressiva, quiescente e “de novo”. Pacientes com episódio de DECH aguda ou overlap não foram incluídos no trabalho.

4.4.3-Variáveis secundárias

Através de consulta ao prontuário, foram coletadas informações como idade, sexo, regime de condicionamento, tipo de doador (aparentado ou não aparentado),

compatibilidade HLA entre o doador e receptor (idêntico ou haploidêntico), fonte das células-tronco hematopoiéticas, gênero do doador e receptor e doença de base.

A intensidade do regime de condicionamento foi classificada conforme critérios preconizados pelo National Institutes of Health (NIH) (Bacigalupo et al., 2009)

4.4.4-Variáveis de desfecho

As variáveis de desfecho do presente trabalho consistiram na quantificação das seguintes citocinas inflamatórias: TNF- α , IL-6, IL-1 β e lactoferrina tanto no plasma, quanto na saliva.

1.Coleta de saliva

Foi seguido o método descrito por Navazesh para realização da coleta de saliva não estimulada (Navazesh, 1993), que foram realizadas no início da manhã, com o paciente sentado, ereto, com a cabeça levemente inclinada para frente. Os pacientes não deveriam ter se alimentado, ingerido água ou escovado os dentes por até uma hora antes da coleta, não deveriam ter feito uso de antisséptico bucal no dia anterior ou no dia da coleta. O paciente foi orientado a acumular saliva e cuspir em frasco plástico descartável pré-pesado a cada 60 segundos até completar 5 minutos. Os frascos com amostras de saliva foram armazenados em gelo seco até o momento do processamento laboratorial. O processamento da amostra consistiu na centrifugação a 13.000 rpm por 10 min em uma temperatura de 4°C, sem diluição. O sobrenadante foi coletado e estocado em eppendorfs de 1,5ml. Após o processamento, aliquotagem e identificação as amostras foram imediatamente estocada em freezer a -80°C. O tempo entre coleta e estocagem das amostras pra congelamento não ultrapassou 4 horas (figura 1).



Figura 1- Coleta de saliva

2. Coleta de plasma

Amostras de sangue periférico (5,0 ml) foram coletadas imediatamente após a coleta de saliva. Foi realizada pela equipe de enfermagem de acordo com o seguinte protocolo: Lavar as mãos, garrotear e escolher a veia adequada, antissepsia, calçar luvas, coleta com auxílio de um frasco de coleta (tampa roxa) contendo um anticoagulante (EDTA), remover antisséptico residual, remover luvas, lavar a mão, identificação dos frascos. Os tubos com as amostras foram armazenados em gelo seco até o momento do processamento laboratorial. O processamento da amostra consistiu em centrifugação a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Após o processamento, alíquotagem e identificação as amostras foram imediatamente estocadas em freezer a -80°C. Assim como para saliva, o tempo ente coleta e congelamento não ultrapassou 4 horas.

A coleta de sangue foi realizada por uma enfermeira treinada e que fez parte do grupo de pesquisadores, todos os processamentos e a coleta de todas as variáveis de saúde bucal foram realizadas por 4 pesquisadores dentistas calibrados. A identificação de suspeita de DECHc, conclusão de diagnóstico e classificação foi realizada pela Dra. Thalita Cristina de Melo Costa, parte do grupo de pesquisadores. A classificação e diagnóstico das lesões de boca foram realizadas exclusivamente pelo autor desta dissertação.

4.5 – Tempos de Coleta e divisão dos grupos

Todos os pacientes do estudo foram submetidos a coleta de índices de saúde bucal, saliva e sangue imediatamente antes do início do condicionamento (T0) e foram mantidos em acompanhamento até completar um ano de transplante. Os pacientes que foram diagnosticados com DECHc foram submetidos novamente a coleta de índices de saúde bucal, sangue e saliva antes do início do tratamento local, ou sistêmico para a complicação. Nos casos, em que o tratamento empírico para DECHc não poderia aguardar o diagnóstico definitivo, os pacientes foram submetidos as coletas antes do início do tratamento e, caso a DECHc não se confirmasse, a coleta era excluída. As coletas no diagnóstico de DECH foram denominadas de T1 DECHc. Os pacientes que concluíram 365 dias pós-transplante sem o diagnóstico de DECHc foram utilizados como controle e submetidos a coleta no D+ 365 ±15 dias. A figura 2 mostra o fluxo de coleta do estudo

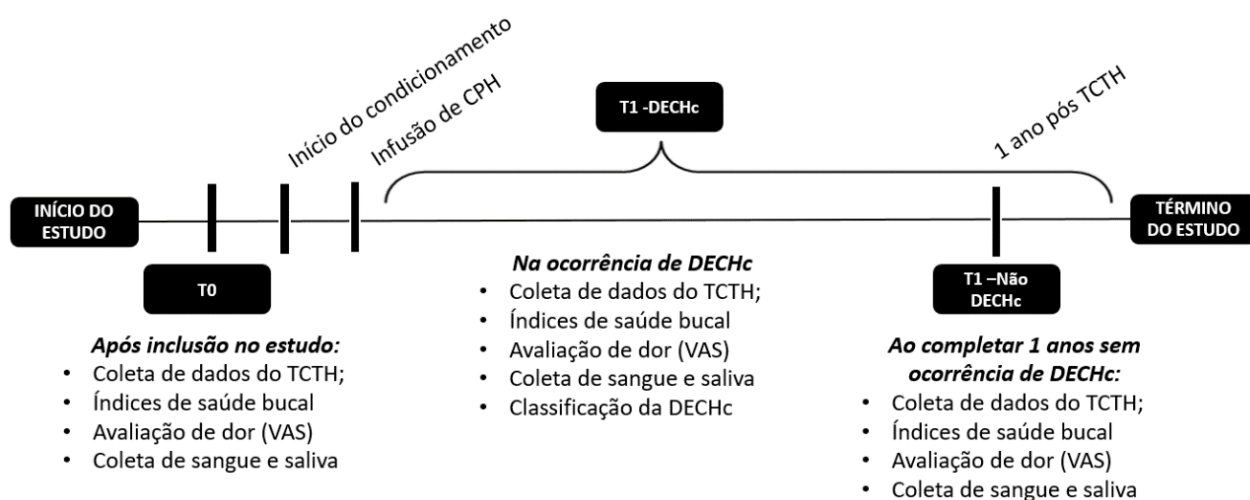


Figura 2- Fluxo de coleta do estudo

4.5 - Quantificação de citocinas inflamatórias, lactoferrina e proteínas totais

A expressão das citocinas inflamatórias foi mensurada por kits de ELISA desenvolvidos pela Peprotech (Califórnia, EUA). Para o preparo da placa de ELISA, foram realizadas diluições dos anticorpos de captura policlonal, para IL-1 β (antigen-affinity purified goat anti IL-1 β), IL-6 (antigen-affinity purified goat anti-hIL-6), IL-8 (antigen-affinity purified rabbit anti-hIL-8) e TNF- α (antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α) com PBS (Phosphate-buffered saline) na concentração de 0,50 μ g/ml (para IL-1 β , IL-8 e IL-6) e 1,0 μ g/ml (para TNF- α). Foram adicionados 100 μ l/poço e a placa foi mantida overnight em temperatura ambiente. Após essa etapa, a placa foi lavada quatro vezes com 300 μ l de 0,05% Tween-20 em PBS. Posteriormente, o bloqueio da placa foi realizado com 300 μ l por poço de albumina de soro bovino a 1% (BSA) diluída em PBS. A placa foi incubada por 60 minutos em temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagens foi repetido. Para determinar o padrão de cada citocina, foram realizadas diluições seriadas de cada proteína em diluente (0,05% de Tween-20, 0,1% de BSA em PBS) partindo de 1000pg/ml para as citocinas IL-1 β , IL-8, 1500pg/ml para IL-6 e 3000pg/ml para TNF- α , conforme a recomendação do fabricante. Foi colocado cem microlitros por poço da proteína padrão em duplicata, iniciando da concentração indicada pelo fabricante seguido de diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128. No último poço foi colocado somente diluente. Seguiu-se à colocação de 100 microlitros das amostras a serem analisadas e incubação da placa por duas horas. Quatro novas lavagens foram realizadas. Após essa etapa, o anticorpo de detecção para IL-1 β (biotinylated Goat anti-human IL-

1 β), IL-8 (biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hIL-8), TNF- α (biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hTNF- α) foram diluídos a 0,50 $\mu\text{g/ml}$ e IL-6 (biotinylated antigen-affinity purified goat anti-hIL-6) a 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Foi adicionado 100 μl /poço do anticorpo de detecção seguido de incubação por duas horas. Procedeu-se ao ciclo de lavagens e início da fase de revelação adicionando o conjugado de estreptavidina-peroxidase, incubação por 30 minutos, novo ciclo de lavagem e adição de ABTS. O desenvolvimento da cor foi monitorado e conduzida a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO), segundo as determinações do fabricante (figuras 3 e 4).

A mensuração da lactoferrina salivar foi determinada pelo kit de ELISA desenvolvido pela Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). A curva padrão foi realizada usando diluições seriadas partindo de 5 $\mu\text{g/ml}$ da proteína obtida do leite humano. Foi adicionado 100 μL por poço em duplicata. As amostras a serem analisadas foram diluídas dez vezes em PBS após observação de melhor detecção nesta diluição (realizado teste piloto anteriormente com diferentes diluições) e colocado 100 μL por poço. As placas foram incubadas a 4°C overnight. Procedeu-se ao bloqueio de ligações não específicas com 200 μL de ovalbumina a 10% por poço e incubação em banho-maria à 37°C durante duas horas. Realizou-se um ciclo de 4 lavagens com 200 μL de PBS por poço e a adição de 100 μL do anticorpo primário policlonal de coelho anti-Lf humana L3262 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) diluído a 1 $\mu\text{L/ml}$ em ovalbumina 1%. Posteriormente a placa foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente. Repetiu-se novo ciclo de lavagens e adição de 100 μL do anticorpo secundário oriundo de ovelha anti-IgG de coelho conjugada a peroxidase (MP Biomedicals, Illkirch, França) diluído a 0,5 $\mu\text{L/ml}$ em ovalbumina 1%, seguido de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS realizou-se a revelação com o-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) segundo as recomendações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO), segundo as determinações do fabricante. (figuras 3 e 4)

Para a avaliação da concentração de proteínas totais foi utilizado o ensaio colorimétrico Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, California, EUA). Foi adicionado 5 μL das amostras a serem analisada e da proteína padrão (Bovine serum albumin standard) em duplicata usando diluições seriadas partindo de 1,5 mg/ml . Seguiu-se à colocação de 25 μL de uma solução alcalina de tartarato de cobre (Bio- Rad DC Protein Assay Reagent A) e após, adição de 200 μL do reagente de Folin diluído (Bio- Rad DC

Protein Assay Reagent B). A placa foi homogeneizada durante 5 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO).(figuras 3 e 4)

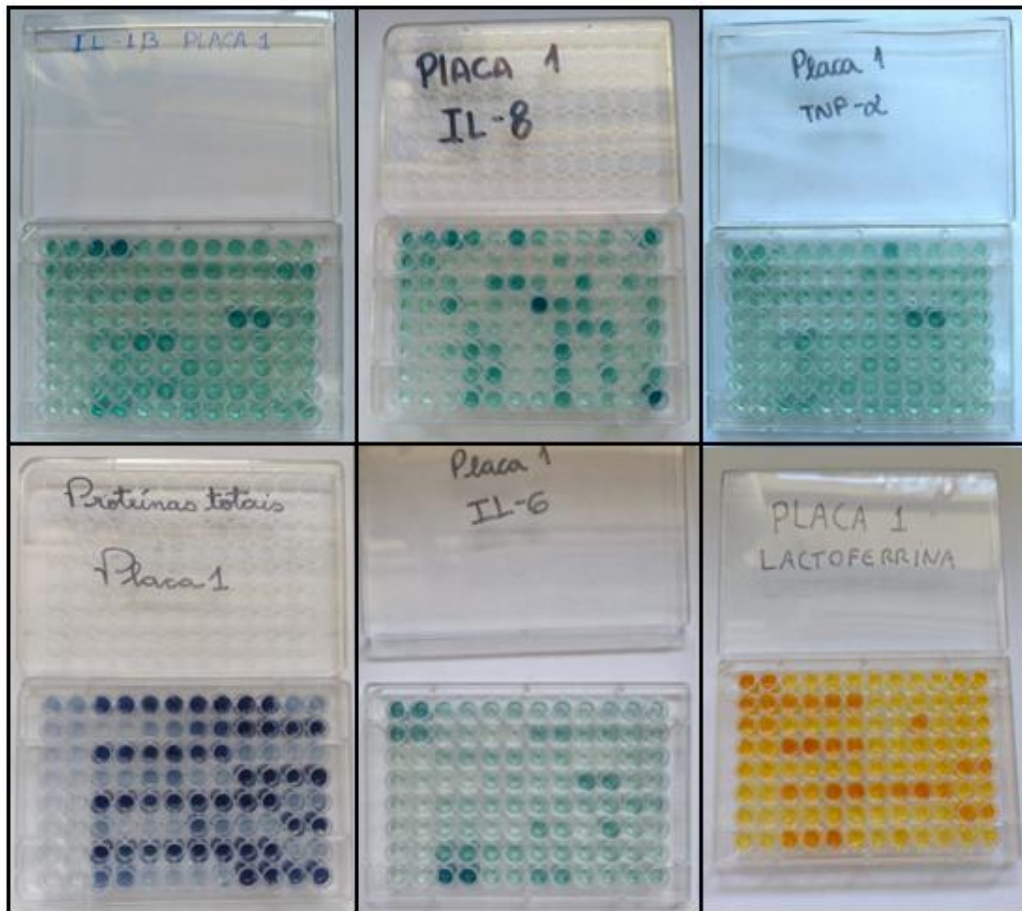


Figura 3- Placas após o desenvolvimento de cor e antes das leituras

IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-6	Lactoferrina	Proteínas Totais
1- Ac. de captura (incubação overnight) 2- Lavagem 4x 3- Bloqueio (incubação 1h) 4- Lavagem 4x 5- Proteína padrão e amostras (incubação 2h) 6- Lavagem 4x 7- Ac. de detecção (incubação 2h) 8- Lavagem 4x 9- Conjugado avidina-peroxidase (incubação 30 min) 10- Lavagem 4x 11- ABTS 12- Leitura	1- Proteína padrão e amostras (incubação overnight) 2- Bloqueio (incubação em banho-maria a 37°C por 2h) 3- Lavagem 4x 4- Ac. Primário (incubação 2h) 5- Lavagem 4x 6- Ac. Secundário (incubação 1h) 7- Revelação com OPD 8- Leitura	1- Proteína padrão e amostras 2- Reagente A 3- Reagente B 4- <u>Homogeneização</u> da placa 5- Leitura

Figura 4 – Etapas laboratoriais

4.6 – Análise dos resultados

Como a expressão de proteínas totais (PT) sofreu variação importante entre o tipo de amostra (plasma e saliva) e entre os pacientes, tendo em vista que a leitura de citocinas pelo método ELISA apresenta correlação linear com o número de proteínas totais, foi optado por ajustar a expressão bruta (leitura original) de citocinas pela quantidade de PT encontrada em cada tipo de amostra. Para tal, foram utilizadas as seguintes fórmulas: 1. plasma: expressão de citocina bruta / quantidade de proteínas totais no plasma; 2. Saliva: expressão de citocina bruta/ quantidade de proteínas totais na saliva. O resultado foi expresso em picograma de citocina por miligramas de proteínas totais por ml.

Através do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que a amostra a ser testada apresentava distribuição não-paramétrica. Foi realizada análise descritiva das variáveis e a comparação das variáveis de saúde bucal e secundárias entre os pacientes que desenvolveram DECHc e os que não apresentaram a complicação nos primeiros 365 dias pós transplante (DECHc X “não-DECHc”).

A comparação de expressão de citocinas entre plasma e saliva foi realizada de forma separada para T0 e T1, incluindo todos os pacientes avaliados em cada tempo, sem distinção de DECHc, ou “não DECHc”, para tal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Da mesma forma, foi testada a correlação da expressão de citocina entre plasma e saliva para T0 e T1 (teste de correlação de Spearman).

A comparação de expressão das citocinas entre os pacientes com DECHc e “não-DECHc” foi realizada de forma separada para plasma e saliva, em cada tempo do estudo: plasmaT0 “nãoDECHc” X plasmaT0 DECHc; Saliva T0 “não DECHc” X Saliva T0 DECHc; Sague T1 “não DECHc” X Plasma T1 DECHc; Saliva T1 “não DECHc” X Saliva T1 DECHc. Essa análise foi realizada com diferentes subgrupos, a saber: incluindo todos os pacientes que desenvolveram DECHc; DECHc exclusiva em boca; DECHc em boca +outros órgãos e DECHc em outros órgãos, sem envolvimento bucal. Todos esses subgrupos foram comparados com o grupo “não-DECHc), tanto em T0, quanto em T1 (teste de Wilcoxon).

Em todas as análises, foi utilizado o nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$)

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Dados Demográficos

Foram incluídos e acompanhados prospectivamente 41 pacientes submetidos ao TCTH alogênico. Após a finalização do estudo, os pacientes foram categorizados em 4 grupos de acordo com o momento da avaliação e desenvolvimento da DECHc. Seis pacientes avaliados no pré TCTH e que posteriormente desenvolveram DECHc foram categorizados no grupo “T0 DECHc”. Em “T0 Não DECH”, foram incluídos 22 pacientes avaliados no pré TCTH e que não desenvolveram DECHc. Treze pacientes foram avaliados no momento do diagnóstico da DECHc (T1 DECHc). 20 Pacientes não desenvolveram DECHc no primeiro ano pós TCTH (T1 Não DECHc).

Comparado ao grupo “Não DECHc”, os pacientes do “Grupo DECHc” apresentaram-se predominantemente do sexo masculino (53,57% X 84,61%), com maior frequência de uso de regime de condicionamento mieloablativo (3,57% X 23,08%) e de intensidade reduzida (50% X 69,23%). Nenhum dos pacientes que desenvolveu DECHc foi submetido ao regime de condicionamento não mieloablativo. No grupo “DECHc” houve predominância de transplantes aparentados haploidênticos (46,15% x 25%), não aparentados idênticos (30,76% x 14,29%) enquanto no “Grupo Não DECHc” houve predominância de transplantes aparentados idênticos (60,71% x 23,08%). O protocolo de profilaxia para DECH mais adotada em ambos os grupos foi o MTX+CSA (64,29% X 46,15%), seguido de CYPT+CSA+MMF (28,57% X 30,76%). Somente no “Grupo Não DECHc” utilizou-se MTX+CSA+ATG associado ou não ao ruxolutinibe (7,14%) e somente no “Grupo DECHc” utilizou-se CSA+MMF (15,38%) e CSA em monoterapia (7,69%). Os dados demográficos com a descrição por grupo e por tempo de coleta estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos

Dados demográficos	Grupo DECHc						Grupo Não DECHc						Grupo DECHc			Grupo Não DECHc		
	T0		T1		T0		T1		T0		T1		N	%	Média (±DP)	N	%	Média (±DP)
Idade	6		41,16 (±14,9)	13		33,84(±16,25)	22		34,90(±16,25)	20		32,55 (±17,14)	13		33,84(±16,25)	28		34,14(±16,12)
Sexo (masculino)	5	83,30%		11	84,61%		11	50,0%		9	45,00%		11	84,61%		15	53,57%	
Sexo do doador/receptor																		
Feminino/masculino	1	16,60%		4	30,76%		4	18,18%		3	15,00%		4	30,76%		6	21,43%	
Outro	5	83,30%		9	69,23%		17	77,27%		16	80,00%		9	69,23%		21	75,00%	
Sem informação	-	-		-	-		1	4,55%		1	5,00%		-	-		1	3,57%	
Doença de base																		
Benigna	2	33,30%		5	38,46%		9	40,91%		10	50,00%		5	38,46%		13	46,43%	
Maligna	4	66,60%		8	61,54%		13	59,09%		10	50,00%		8	61,54%		15	53,57%	
Condicionamento																		
Mieloablativo	1	16,60%		3	23,08%		8	36,36%		11	55,00%		3	23,08%		1	3,57%	
Intensidade reduzida	5	83,30%		9	69,23%		14	63,64%		8	40,00%		9	69,23%		14	50,00%	
Não mioablativo	-	-		-	-		-	-		1	5,00%		-	-		13	46,43%	
Sem informação	-	-		1	7,69%		-	-		-	-		1	7,69%		-	-	
Fonte de células																		
Sangue periférico	3	50,00%		4	30,77%		11	50,00%		7	35,00%		4	30,77%		11	39,29%	
Medula óssea	3	50,00%		9	69,23%		11	50,00%		13	65,00%		9	69,23%		17	60,71%	
Doador																		
Aparentado idêntico	2	33,30%		3	23,08%		11	50,00%		13	65,00%		3	23,08%		17	60,71%	
Não aparentado idêntico	1	16,60%		4	30,76%		4	18,18%		2	10,00%		4	30,76%		4	14,29%	
Aparentado haploidêntico	3	50,00%		6	46,15%		7	31,82%		5	25,00%		6	46,15%		7	25,00%	
Compatibilidade ABO																		
Isogrupo ABO	4	66,60%		9	69,23%		14	63,64%		14	70,00%		9	69,23%		19	67,86%	
Incompatível	2	33,30%		3	23,08%		8	36,36%		6	30,00%		3	23,08%		9	32,14%	
Sem informação	-	-		1	7,69%		-	-		-	-		1	7,69%		-	-	
Profilaxia para DECH																		
MTX+CSA	3	50,00%		6	46,15%		12	54,55%		13	65,00%		6	46,15%		18	64,29%	
MTX + CSA+ATG + RUXOLITNIB	-	-		-	-		1	4,55%		-	-		-	-		1	3,57%	
MTX + CSA + ATG	-	-		-	-		1	4,55%		1	5,00%		-	-		1	3,57%	
CYPT + CSA + MMF	2	33,30%		4	30,76%		8	36,36%		6	30,00%		4	30,76%		8	28,57%	
CSA + MMF	1	16,60%		2	15,38%		-	-		-	-		2	15,38%		-	-	
CSA	-	-		1	7,69%		-	-		-	-		1	7,69%		-	-	

5.2 Classificação da DECHc

Dentre os 13 pacientes com diagnóstico de DECHc, 6 (46,15%) apresentaram DECHc “De Novo”, ou seja, não desenvolveram DECH aguda anterior. Três (23,08%) apresentaram DECHc progressiva, ou seja, com envolvimento anterior e ininterrupto da forma aguda da doença. Outros 3 pacientes tiveram acometimento prévio pela doença aguda seguido de um período de resolução e, portanto, classificados como DECHc quiescente. Apenas 1 paciente apresentou envolvimento prévio pela DECHc seguido de resolução e com recorrência posterior (classificado como DECHc reativada). 38,46% dos pacientes apresentaram DECHc de boca exclusivo, 23,08% apresentaram DECHc em boca associado ao envolvimento de outro(s) órgão(s). 38,46% dos pacientes apresentaram DECHc sem envolvimento oral. A maior parte dos casos foi classificado como leve (61,54%) e 23,08% desenvolveram a forma grave da doença. O tempo desde o transplante até o diagnóstico da doença foi em média 330 (± 234) dias, com uma mediana de 258 (47-764). (Tabela 2)

Tabela 2 - Classificação da DECHc

Classificação	Grupo DECHc		
	N	%	Mediana (variação) Pontuação gravidade em boca
De acordo com histórico de DECHa anterior			
DECH crônica "De Novo"	6	46,15%	
DECH crônica Progressiva	3	23,08%	
DECH crônica Quiescente	3	23,08%	
DECH crônica reativada (flare)	1	7,69%	
De acordo com o órgão envolvido			
DECHc exclusivo de boca	5	38,46%	0 (0-3)
DECHc em boca e em outro(s) órgão(s)	3	23,08%	0 (0-2)
DECHc sem envolvimento de boca	5	38,46%	-
De acordo com a Classificação Global			
Leve	8	61,54%	
Moderada	2	15,38%	
Grave	3	23,08%	
Dias até o diagnóstico da DECHc	-	-	258 (47-764)

5.3 Dados de Saúde Bucal

Os pacientes que desenvolveram DECHc apresentaram maior PSR no T0 (2, 1-3) em comparação com os outros tempos e grupos (1, 0-3 em T1 do Grupo DECHc; 1, 0-3 em T0 do Grupo Não DECHc e 1, 0-2 em T1 do mesmo grupo). Semelhantemente, o grupo de pacientes que desenvolveu DECHc apresentou maior número de sextantes com doença periodontal quando comparado ao “Grupo Não DECHc”, independentemente do tempo avaliado (T0 DECHc 3,33%; T1 DECHc 3,03% X T0 Não DECHc 0,88%; T1 Não DECHc 0%). Maior CPOD foi observado no T0 do “Grupo DECHc” (14, 6-28) quando comparado ao T1 (8, 0-28) e ao “Grupo Não DECHc” (9, 0-28 em T0 e 7, 0-28 em T1). Os pacientes do “Grupo DECHc” também apresentaram maior frequência de higiene oral classificada como insatisfatória (T0 40%; T1 8,33%), quando comparado ao “Grupo Não DECHc” (T0 11,11%; T1 6,25%), apesar de não haver diferença no índice de placa. Não houve diferença na avaliação de dor em cavidade oral (VAS) entre os grupos e o fluxo salivar apresentou-se aumentado no grupo de pacientes que desenvolveu DECHc (T0 DECHc 0,9ml/min; T1 DECHc 0,53ml/min x T0 Não DECHc 0,3ml/min; T1 Não DECHc 0,36ml/min). Os dados de saúde bucal estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados de Saúde Bucal

Dados de Saúde bucal	Grupo DECHc						Grupo Não DECHc					
	T0			T1 DECHc			T0			T1 Não DECHc		
	N	%	Mediana (variação)	N	%	Mediana (variação)	N	%	Mediana (variação)	N	%	Mediana (variação)
PSR	5		2 (1-3)	11		1 (0-3)	19		1 (0-3)	16		1 (0-2)
Índice de Placa	5		0,12 (0-1,83)	12		0,14 (0-2,4)	18		0,16 (0 - 1,41)	16		0,18 (0-1,04)
CPO-D	6		14 (6-28)	13		8 (0-28)	22		9 (0-28)	20		7 (0-28)
Sextantes com PSR 3 ou 4	1 de 30	3,33%	-	2 de 66	3,03%		1 de 114	0,88%	-	0 de 96	0,00%	-
Pacientes com higiene oral insatisfatória	2 de 5	40,00%	-	1 de 12	8,33%		2 de 18	11,11%	-	1 de 16	6,25%	-
Dor (VAS)	6		0 (0-0)			0 (0-7)	22		0,13 (0-3)	19		0 (0-0)
Fluxo salivar (ml/min)	6		0,9 (0,32-1,62)			0,53 (0,14-1,14)	22		0,3 (0,04-0,76)	20		0,36 (0,14-0,96)

*Para o PSR foram excluídos os pacientes com dados não coletados, Criança menor que 15 anos e pacientes edêntulos

*Para o índice de placa foram excluídos os pacientes edêntulos e os com dados não coletados

5.4 Comparação e correlação da expressão de citocinas no plasma e na saliva

A saliva apresentou maior expressão de IL-8, IL-1 β e Lactoferrina ($p < 0,000$) em T0 e de IL-8 ($p < 0,0000$), IL-1 β ($p = 0,001$), IL-6 (0,048) e lactoferrina ($< 0,0000$) em T1, quando comparadas com as amostras de plasma. Os valores brutos da expressão das citocinas e os valores corrigidos pela quantidade de proteínas totais podem ser consultados na tabela 4. O teste de Spearman mostrou correlação significativa e positiva entre plasma e saliva para IL-8 ($r = 0,63/p = 0,001$), IL-1 β ($r = 0,59/p = 0,001$), IL-6 ($r = 0,59/p = 0,001$) em T0; e para IL-1 β ($r = 0,53/p = 0,002$), IL-6 ($r = 0,78/p < 0,001$) e lactoferrina ($r = 0,63/p < 0,001$), em T1 (Tabela 5, figura 5).

Tabela 4 - Expressão de citocinas inflamatórias e sua correção por proteínas totais

Citocinas	Grupo DECHc (n=13)		Grupo Não DECHc (n=28)	
	T0 Média (\pm DP)	T1 DECHc TMédia (\pm DP)	T0 Média (\pm DP)	T1 Não DECHc Média (\pm DP)
IL-8 Plasma	68,39 (\pm 45,95)	137,03 (\pm 124,19)	82,61 (\pm 44,00)	88,09 (\pm 68,87)
IL-8 Saliva	702,73 (\pm 235,57)	664,31 (\pm 240,56)	756,11 (\pm 364,48)	439,15 (\pm 276,40)
IL-1 β Plasma	624,59 (\pm 495,28)	622,47 (\pm 553,19)	769,25 (\pm 403,58)	422,80 (\pm 465,08)
IL-1 β Saliva	391,79 (\pm 663,03)	293,51 (\pm 336,82)	418,81 (\pm 422,51)	157,19 (\pm 152,02)
TNF- α Plasma	932,86 (\pm 1390,72)	489,79 (\pm 224,034)	680,36 (\pm 497,95)	612,77 (\pm 372,98)
TNF- α Saliva	0 (\pm 0)	272,66 (\pm 440,20)	316,01 (\pm 472,48)	436,45 (\pm 658,07)
IL-6 Plasma	324,07 (\pm 390,87)	273,00 (\pm 97,10)	169,32 (\pm 158,18)	202,95 (\pm 133,41)
IL-6 Saliva	116,03 (\pm 219,18)	213,12 (\pm 258,29)	79,95 (\pm 112,58)	74,73 (\pm 120,60)
Lactoferrina Plasma	32,35 (\pm 17,27)	13,94 (\pm 10,02)	22,97 (\pm 20,31)	13,42 (\pm 13,51)
Lactoferrina Saliva	211,72 (\pm 59,29)	201,05 (\pm 93,58)	160,36 (\pm 81,24)	181,56 (\pm 69,56)
Proteínas totais Plasma	8255,23 (\pm 807,28)	7941,19 (\pm 1302,27)	8374,31 (\pm 948,75)	8216,05 (\pm 1428,62)
Proteínas totais Saliva	1969,00 (\pm 846,24)	1683,02 (\pm 675,71)	1617,34 (\pm 881,08)	1586,66 (\pm 952,63)
Correção por proteínas totais				
IL-8 Plasma (index PT)	0,00848 (\pm 0,00553)	0,01655 (\pm 0,0133)	0,01027 (\pm 0,00567)	0,01099 (\pm 0,00852)
IL-8 Saliva (index PT)	0,4307 (\pm 0,32684)	0,4347 (\pm 0,19884)	0,63388 (\pm 0,49124)	0,42582 (\pm 0,549)
IL-1 β Plasma (index PT)	0,07813 (\pm 0,06673)	0,08056 (\pm 0,06789)	0,08924 (\pm 0,04555)	0,05834 (\pm 0,0761)
IL-1 β Saliva (index PT)	0,15186 (\pm 0,17865)	0,19285 (\pm 0,23173)	0,39644 (\pm 0,51878)	0,21222 (\pm 0,45953)
TNF- α Plasma (index PT)	0,12268 (\pm 0,19252)	0,06401 (\pm 0,03146)	0,08571 (\pm 0,06494)	0,07289 (\pm 0,0437)
TNF- α Saliva (index PT)	0 (\pm 0)	0,14694 (\pm 0,20413)	0,44297 (\pm 1,00276)	0,26377 (\pm 0,35761)
IL-6 Plasma (index PT)	0,04223 (\pm 0,05454)	0,03643 (\pm 0,01716)	0,02351 (\pm 0,02549)	0,02554 (\pm 0,01895)
IL-6 Saliva (index PT)	0,0627 (\pm 0,11282)	0,14642 (\pm 0,20825)	0,13480 (\pm 0,29226)	0,06243 (\pm 0,14558)
Lactoferrina Plasma (index PT)	0,00396 (\pm 0,00214)	0,00177 (\pm 0,00128)	0,00281 (\pm 0,00234)	0,00182 (\pm 0,00213)
Lactoferrina Saliva (index PT)	0,12138 (\pm 0,06178)	0,14287 (\pm 0,09423)	0,13772 (\pm 0,09405)	0,19584 (\pm 0,2211)

Tabela 5 - Comparação e correlação da expressão de citocinas no plasma e na saliva

Citocinas	Plasma	Saliva	p	Wilcoxon	Spearman	
				Amostra em superioridade	r	p
T0 (ambos os grupos)					r	p
IL-8	0,009872441 (±0,0055889773)	0,586999849 (±0,4608556188)	<0,000	Saliva	0,63	0,001
IL-1β	0,086776394 (±0,0497488632)	0,340001226 (±0,4711352687)	<0,000	Saliva	0,59	0,001
TNF-α	0,093933010 (±0,1030421306)	0,340747265 (±0,8946659172)	0,585	-	0,04	0,85
IL-6	0,027673937 (±0,0336901051)	0,118168346 (±0,2615773483)	0,288	-	0,59	0,001
Lactoferrina	0,003066178 (±0,0023129611)	0,133950894 (±0,0868108385)	<0,000	Saliva	0,02	0,92
T1 (ambos os grupos)					r	p
IL-8	0,013325517 (±0,0109453259)	0,429321572 (±0,4402327925)	<0,000	Saliva	0,22	0,25
IL-1β	0,067666545 (±0,0724562169)	0,204593811 (±0,3815930652)	0,001	Saliva	0,53	0,002
TNF-α	0,069169413 (±0,0387062146)	0,217749771 (±0,3080930186)	0,142	-	0,03	0,86
IL-6	0,030111309 (±0,0187410334)	0,095523619 (±0,1748847648)	0,048	Saliva	0,78	<0,001
Lactoferrina	0,001804981 (±0,0018009124)	0,174980222 (±0,1817876964)	<0,000	Saliva	0,63	<0,001
T0 grupo Não DEHC					r	p
IL-8	0,010136009 (±0,0057881977)	0,633887439 (±0,4912409409)	<0,000	Saliva	-	-
IL-1β	0,090069260 (±0,0465790363)	0,396440810 (±0,5187816423)	<0,000	Saliva	-	-
TNF-α	0,080581591 (±0,0621020194)	0,442971444 (±1,002760131)	0,709	-	-	-
IL-6	0,023010390 (±0,0260479269)	0,134806321 (±0,2922622062)	0,126	-	-	-
Lactoferrina	0,002950655 (±0,0023128953)	0,137720291 (±0,0940562089)	<0,000	Saliva	-	-
T1 grupo Não DEHC					r	p
IL-8	0,010995218 (±0,0085288846)	0,446227664 (±0,5765638016)	<0,000	Saliva	-	-
IL-1β	0,058349575 (±0,0761041686)	0,218537331 (±0,4825274203)	0,048	Saliva	-	-
TNF-α	0,072892061 (±0,0437052376)	0,228994742 (±0,3016452220)	0,184	-	-	-
IL-6	0,025543212 (±0,0189515481)	0,066461395 (±0,1530894276)	0,616	-	-	-
Lactoferrina	0,001825397 (±0,0021349340)	0,203813735 (±0,2322921553)	<0,000	Saliva	-	-
T0 grupo DEHC					r	p
IL-8	0,008480200 (±0,0055330527)	0,430707884 (±0,3268424585)	0,028	Saliva	-	-
IL-1β	0,078136966 (±0,0667306211)	0,151869276 (±0,1786545630)	0,249	-	-	-
TNF-α	0,122686892 (±0,1925232488)	0,000000000 (±0,0000000000)	0,028	Plasma	-	-
IL-6	0,042237514 (±0,0545471559)	0,062708428 (±0,1128270560)	0,600	-	-	-
Lactoferrina	0,003962283 (±0,0021432651)	0,121386239 (±0,0617848098)	0,028	Saliva	-	-
T1 grupo DEHC					r	p
IL-8	0,016552086 (±0,0133050990)	0,434703568 (±0,1988415107)	0,001	Saliva	-	-
IL-1β	0,080566965 (±0,0678907009)	0,192855748 (±0,2317311592)	0,007	Saliva	-	-
TNF-α	0,064014977 (±0,0314613338)	0,146943699 (±0,2041303418)	0,507	-	-	-
IL-6	0,036436368 (±0,0171642844)	0,146423908 (±0,2082523657)	0,028	Saliva	-	-
Lactoferrina	0,001776713 (±0,0012843820)	0,142874665 (±0,0942320420)	0,001	Saliva	-	-

Em negritos dados com relação estatística significativa

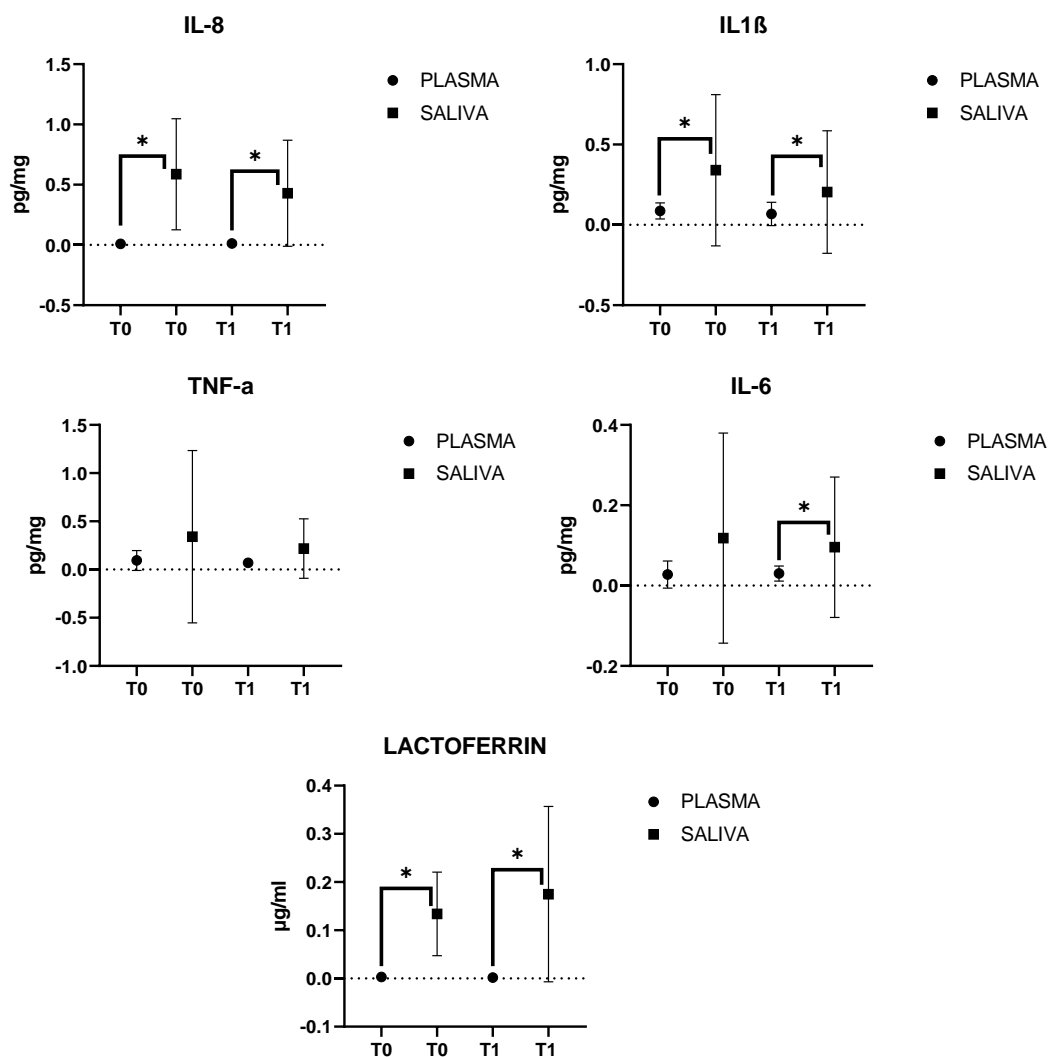


Figura 5- Comparação da expressão de citocinas entre plasma e saliva nos dois tempos estudados, incluindo toda população estudada (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

Ao se avaliar somente o grupo que não desenvolveu DECHc, maior expressão de IL-8 ($p < 0,000$), IL-1 β ($p < 0,000$) e lactoferrina ($p < 0,000$) foi encontrada na saliva em T0 e IL-8 ($p = 0,048$), IL-1 β ($p < 0,000$) e lactoferrina ($p < 0,000$) na saliva em T1 (Tabela 5, figura 6).

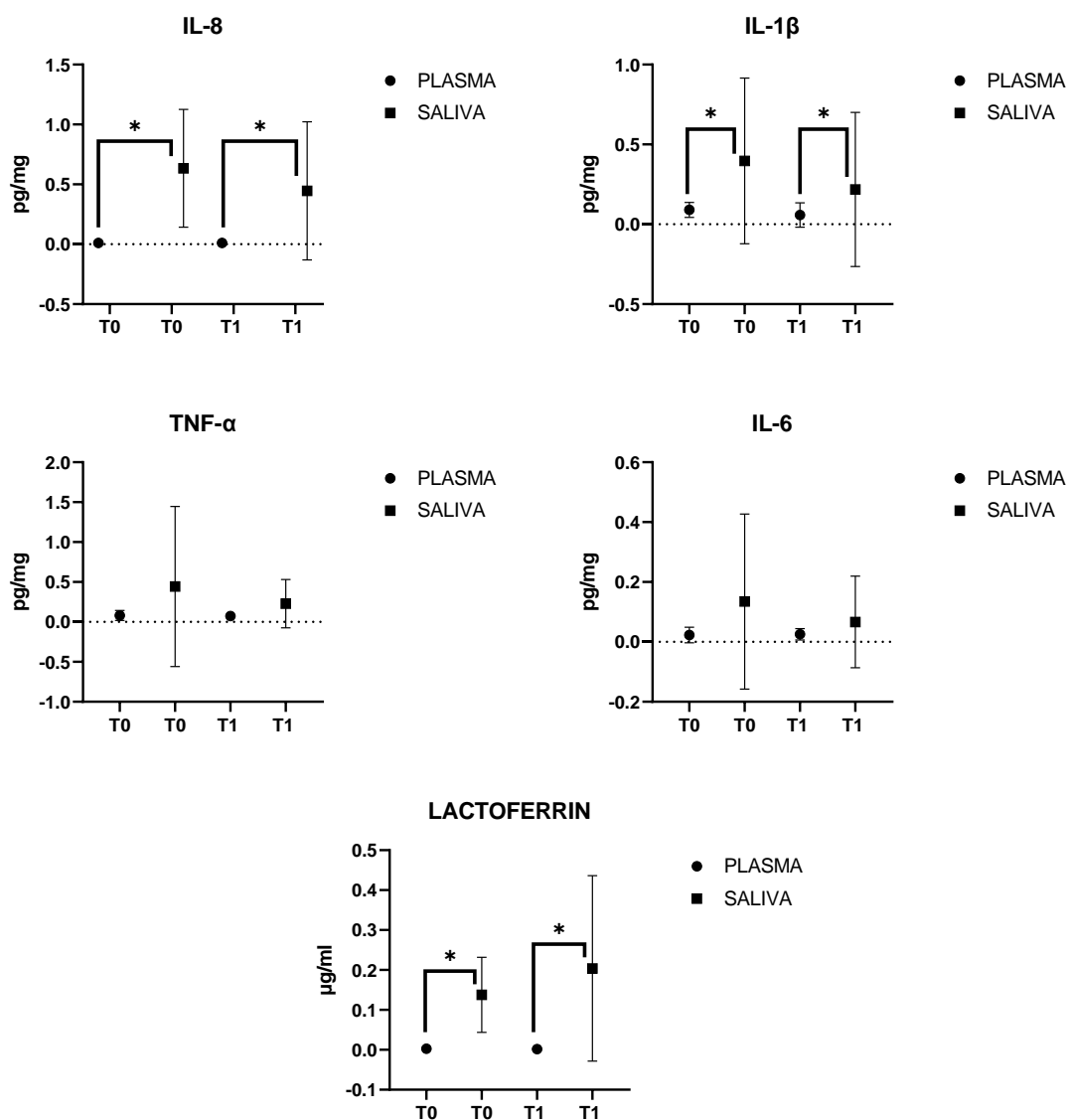


Figura 6- Comparação da expressão de citocinas entre plasma e saliva nos dois tempos estudados, apenas para os pacientes que não desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

Avaliando apenas o grupo que desenvolveu DECHc, maior expressão de IL-8 ($p=0,028$) e lactoferrina ($p<0,000$) foi observado na saliva e TNF- α ($p=0,028$) no plasma em T0. Em T1, observou-se maior expressão de IL-8 ($p= 0,001$), IL-1 β ($p= 0,007$), IL-6 ($p= 0,028$) e lactoferrina ($p= 0,001$) na saliva (Tabela 5, figura 7).

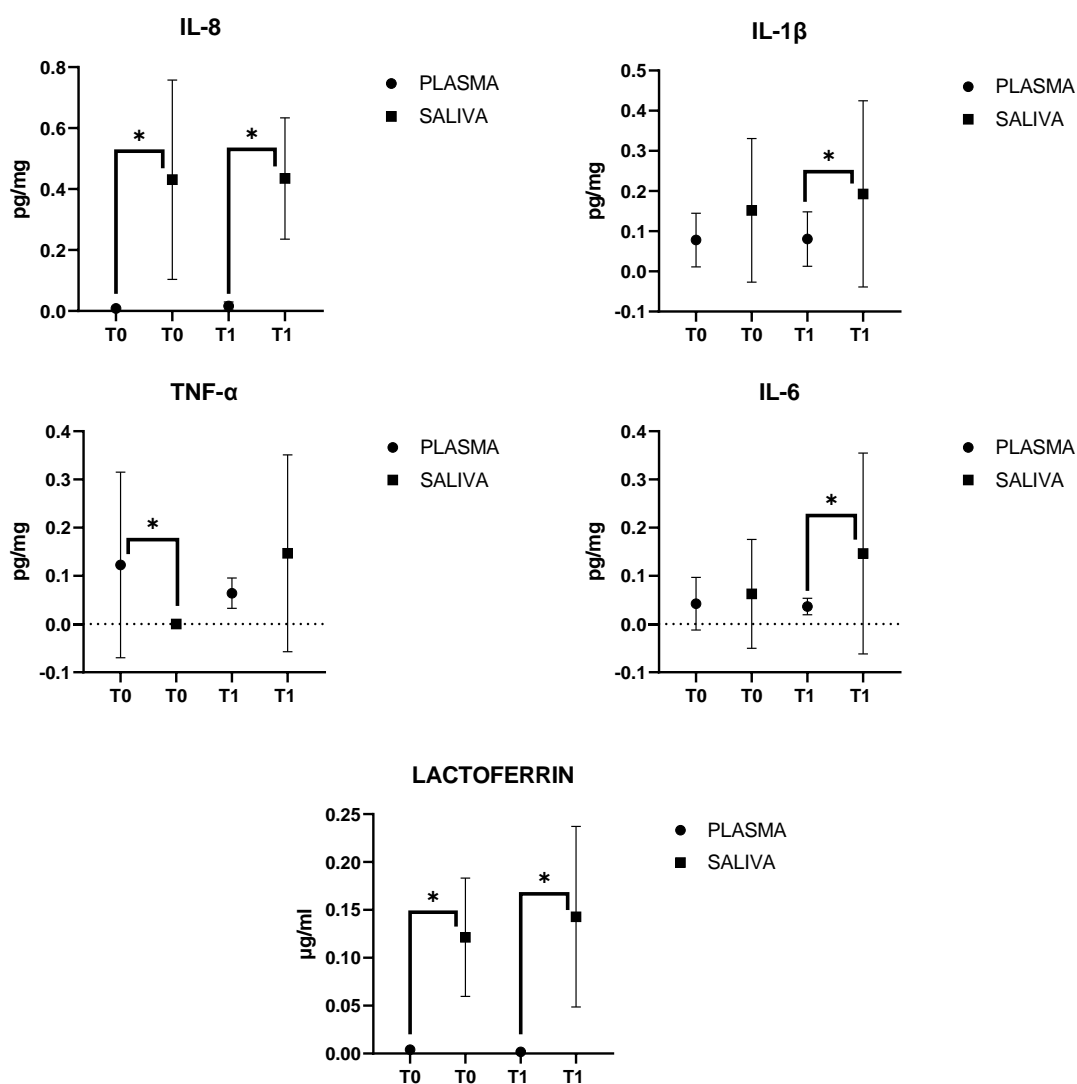


Figura 7- Comparação da expressão de citocinas entre plasma e saliva nos dois tempos estudados, apenas para os pacientes que desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

5.5 Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1

As amostras de plasma mostraram expressão significativamente maior das citocinas IL-1β ($p=0,008$) e lactoferrina ($p=0,02$) em T0, quando comparada com T1. Dentre as amostras de saliva, a quantificação de IL-8 foi significativamente maior em T0 ($p=0,018$). Não houve diferença entre as demais citocinas na comparação T0xT1, tanto para plasma, quanto para saliva, incluindo toda a população estudada (Tabela 6, figura 8).

Tabela 6- Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1

Citocinas	T0	T1	Wilcoxon	T0	T1	Wilcoxon		
	Plasma	Plasma	p					Amostra em superioridade
Ambos os grupos								
IL-8	0,009872441 (±0,0055889773)	0,013325517 (±0,0109453259)	0,647	-	0,586999849 (±0,4608556188)	0,429321572 (±0,4402327925)	0,018	T0
IL-1β	0,086776394 (±0,0497488632)	0,067666545 (±0,0724562169)	0,008	T0	0,340001226 (±0,4711352687)	0,204593811 (±0,3815930652)	0,07	-
TNF-α	0,09393301 (±0,1030421306)	0,069169413 (±0,0387062146)	0,396	-	0,340747265 (±0,8946659172)	0,217749771 (±0,3080930186)	0,46	-
IL-6	0,027673937 (±0,0336901051)	0,030111309 (±0,0187410334)	0,744	-	0,118168346 (±0,2615773483)	0,095523619 (±0,1748847648)	0,286	-
Lactoferrina	0,003066178 (±0,0023129611)	0,001804981 (±0,0018009124)	0,02	T0	0,133950894 (±0,0868108385)	0,174980222 (±0,1817876964)	0,601	-
Grupo Não DECHc								
IL-8	0,011243075 (±0,0058965070)	0,008522650 (±0,0080293006)	0,182	-	0,684064825 (±0,5426188646)	0,244148912 (±0,0964706620)	0,007	T0
IL-1β	0,099609592 (±0,0511715888)	0,029845466 (±0,0257850264)	0,003	T0	0,468078061 (±0,5931044591)	0,106880078 (±0,1245294230)	0,013	T0
TNF-α	0,061287072 (±0,0552473742)	0,067546564 (±0,0419295335)	0,347	-	0,649985537 (±1,2059553489)	0,319257237 (±0,4135761049)	0,814	-
IL-6	0,022660921 (±0,0270835069)	0,017012893 (±0,0080229870)	0,937	-	0,173566979 (±0,3493446087)	0,014275868 (±0,0234257041)	0,071	-
Lactoferrina	0,003436642 (±0,0019990842)	0,001616377 (±0,0021650750)	0,071	-	0,156552518 (±0,1065231651)	0,124595643 (±0,0929795205)	0,345	-
Grupo DECHc								
IL-8	0,008480200 (±0,0055330527)	0,014482173 (±0,0098460601)	0,345	-	0,430707884 (±0,3268424585)	0,372824090 (±0,1389952382)	0,917	-
IL-1β	0,078136966 (±0,0667306211)	0,074368076 (±0,0833977631)	0,753	-	0,151869276 (±0,1786545630)	0,270700831 (±0,3332629418)	0,463	-
TNF-α	0,122686892 (±0,1925232488)	0,055732963 (±0,0274493189)	0,917	-	0,000000000 (±0,0000000000)	0,151807171 (±0,2399358054)	0,109	-
IL-6	0,042237514 (±0,0545471559)	0,028068890 (±0,0095792338)	0,6	-	0,062708428 (±0,1128270560)	0,075387047 (±0,0824652682)	0,463	-
Lactoferrina	0,003962283 (±0,0021432651)	0,001691134 (±0,0010028691)	0,116	-	0,121386239 (±0,0617848098)	0,151588387 (±0,0818254133)	0,463	-

Em negritos dados com relação estatística significativa

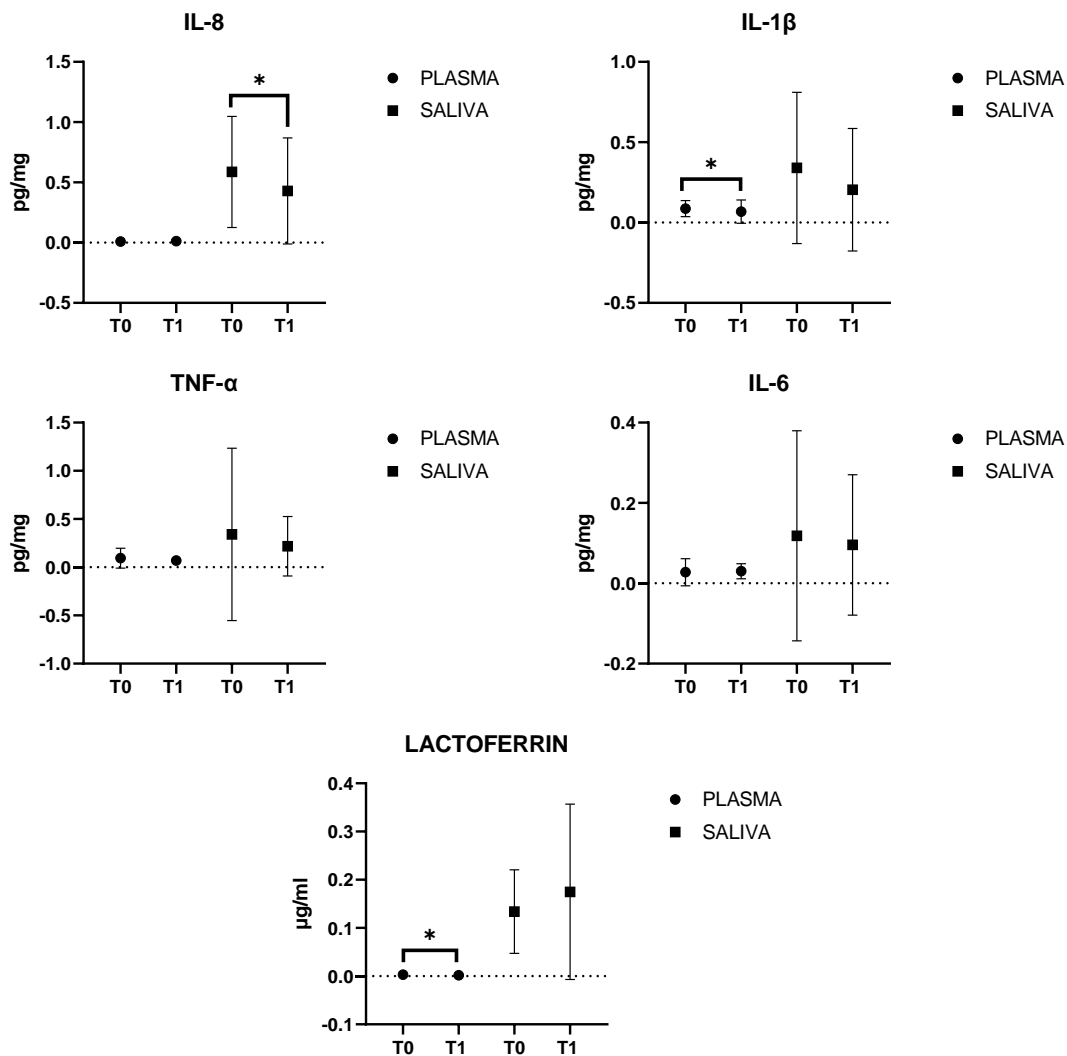


Figura 8- Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1, para plasma e saliva, incluindo toda população estudada (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

Quando avaliado somente o grupo que não desenvolveu DECHc, observou-se maiores níveis de IL-1β ($p=0,003$) em plasma no T0, quando comparado com plasma em T1; e IL-8 ($p=0,007$) e IL-1β ($p=0,013$) na saliva em T0, na comparação com saliva em T1 (Tabela 6, figura 9).

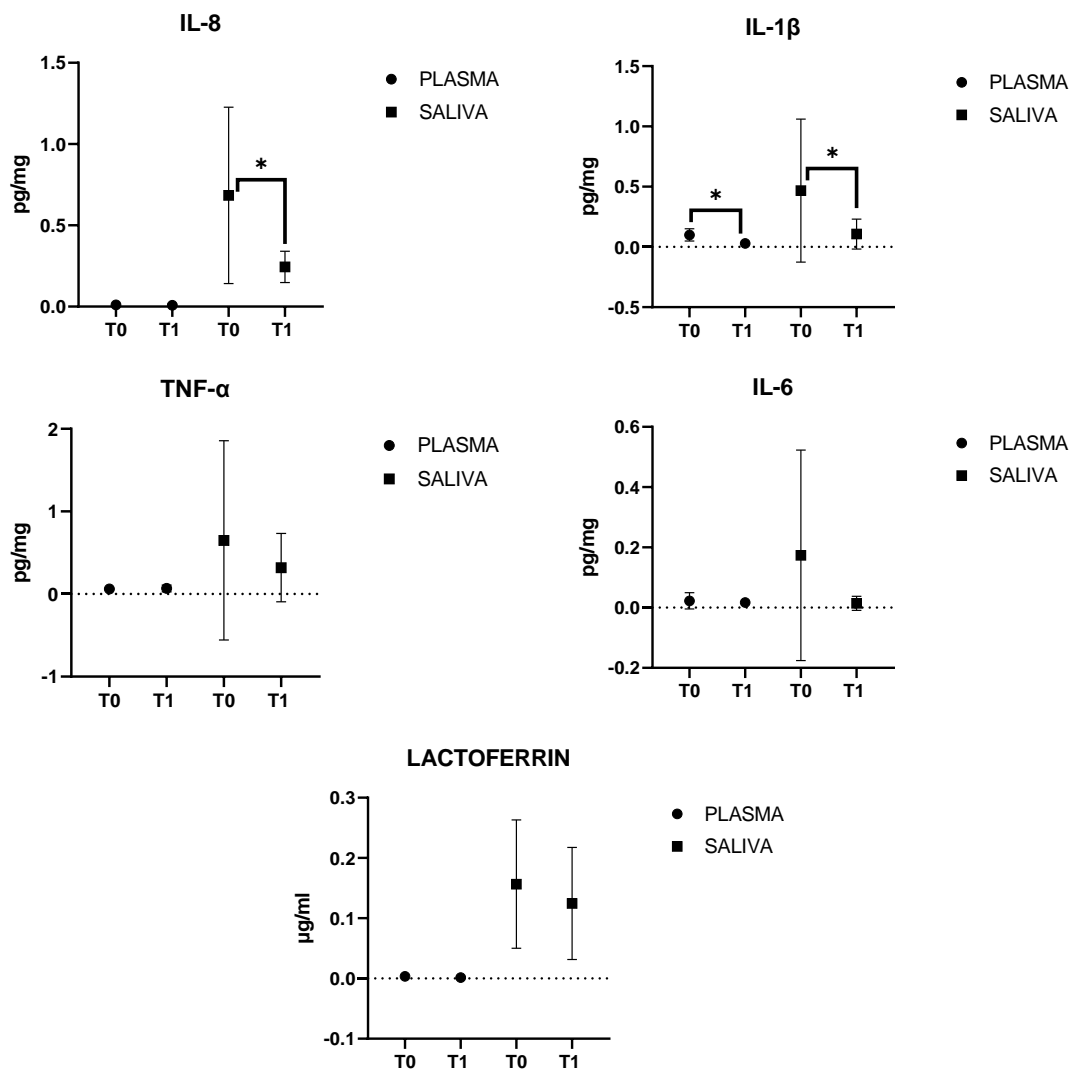


Figura 9- Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1, para plasma e saliva, incluindo apenas os pacientes que não desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

No grupo que desenvolveu DECHc não foram identificadas diferenças significativas na expressão de citocinas comparando T0 e T1, tanto para plasma, quanto para saliva (Tabela 6, figura 10).

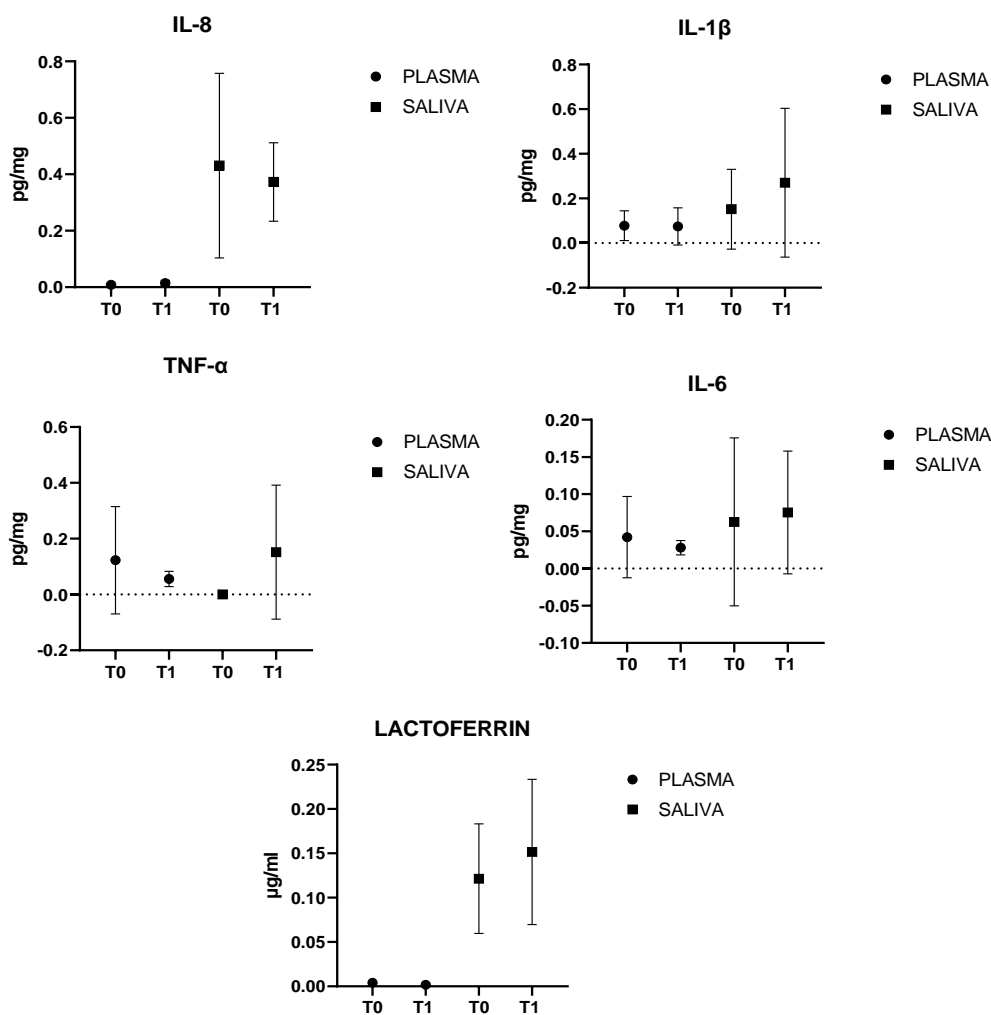


Figura 10- Comparação da expressão de citocinas entre T0 e T1, para plasma e saliva, incluindo apenas os pacientes que desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas).

5.6 Comparação da expressão de citocinas em pacientes com e sem DECHc

A expressão das citocinas IL-6 ($0,036436368 \pm 0,0171642844$ X $0,025543212 \pm 0,0189515481$, $p=0,034$) em plasma; e IL-8 ($0,434703568 \pm 0,1988415107$ X $0,425823276 \pm 0,5490029478$, $p=0,055$) e IL-6 ($0,146423908 \pm 0,2082523657$ X $0,062438431 \pm 0,1455855168$, $p=0,009$) na saliva, foi significativamente maior no T1 de pacientes que desenvolveram DECHc (qualquer órgão, ou extensão), quando comparado aos pacientes que não desenvolveram a complicação. Por outro lado, uma maior expressão de TNF- α em saliva foi observada no T0 de pacientes que não desenvolveram DECHc ($0,442971444 \pm 1,0027601313E0$ X $0,000000000 \pm 0,000000000$, $p=0,026$) (Tabela 7, figura 11).

Tabela 7- Comparação da expressão de citocinas em pacientes com e sem DECHc

	T0		Mann-Whitney		T1		Mann-Whitney	
	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade
Citocinas em plasma								
IL-8	0,008480200 (±0,0055330527)	0,010270224 (±0,0056750644)	0,484	-	0,016552086 (±0,0133050990)	0,010995218 (±0,0085288846)	0,072	-
IL-1β	0,078136966 (±0,0667306211)	0,089244802 (±0,0455565654)	0,521	-	0,080566965 (±0,0678907009)	0,058349575 (±0,0761041686)	0,161	-
TNF-α	0,122686892 (±0,1925232488)	0,085717615 (±0,0649444493)	0,56	-	0,064014977 (±0,0314613338)	0,072892061 (±0,0437052376)	0,631	-
IL-6	0,042237514 (±0,0545471559)	0,023512915 (±0,0254926057)	0,268	-	0,036436368 (±0,0171642844)	0,025543212 (±0,0189515481)	0,034	DECHc
Lactoferrina	0,003962283 (±0,0021432651)	0,002810148 (±0,0023444827)	0,207	-	0,001776713 (±0,0012843820)	0,001825397 (±0,0021349340)	0,616	-
Citocinas em saliva								
IL-8	0,430707884 (±0,3268424585)	0,633887439 (±0,4912409409)	0,248	-	0,434703568 (±0,1988415107)	0,425823276 (±0,5490029478)	0,055	DECHc
IL-1β	0,151869276 (±0,1786545630)	0,396440810 (±0,5187816423)	0,128	-	0,192855748 (±0,2317311592)	0,212223552 (±0,4595350723)	0,113	-
TNF-α	0,000000000 (±0,000000000)	0,442971444 (±1,0027601313)	0,026	Não DECHc	0,146943699 (±0,2041303418)	0,263773719 (±0,3576172555)	0,754	-
IL-6	0,062708428 (±0,1128270560)	0,134806321 (±0,2922622062)	0,806	-	0,146423908 (±0,2082523657)	0,062438431 (±0,1455855168)	0,009	DECHc
Lactoferrina	0,121386239 (±0,0617848098)	0,137720291 (±0,0940562089)	0,715	-	0,142874665 (±0,0942320420)	0,195848835 (±0,2211013639)	0,632	-

Em negritos dados com relação estatística significante

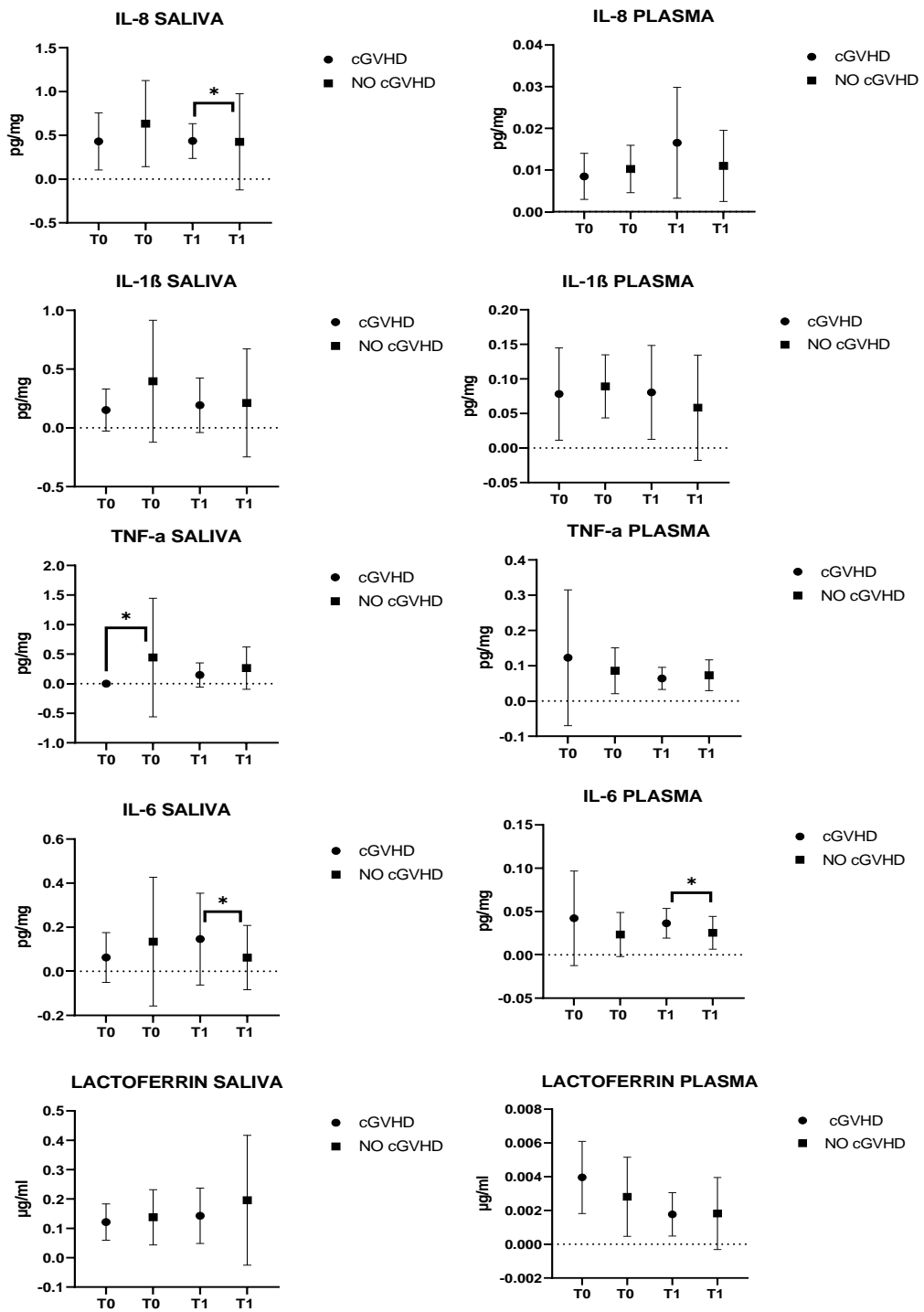


Figura 11- Comparação da expressão de citocinas entre os grupos com e sem DECHc, para plasma e saliva (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

Não foi observada diferença da expressão de citocinas na comparação entre os pacientes que desenvolveram DECHc exclusiva em boca, com o grupo “Não-DECHc” (Tabela 8, figura 12).

Tabela 8- Comparação da expressão de citocinas em pacientes com DECHc exclusiva de boca e sem a doença

	T0		Mann-Whitney		T1		Mann-Whitney	
	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade
Citocinas em plasma								
IL-8	0,010331417 (±0,0061541815)	0,009815069 (±0,0056556800)	0,817	-	0,012971714 (±0,0068113401)	0,013393556 (±0,0116750694)	0,555	-
IL-1β	0,083779331 (±0,0959139747)	0,087151027 (±0,0446821565)	0,537	-	0,074812969 (±0,0486253639)	0,066292233 (±0,0768726045)	0,361	-
TNF-α	0,215452782 (±0,2581086415)	0,078743039 (±0,0635817673)	0,217	-	0,065820553 (±0,0388541062)	0,069813424 (±0,0394155844)	0,83	-
IL-6	0,062755628 (±0,07744607540)	0,023288726 (±0,0241022429)	0,316	-	0,030457018 (±0,0182225669)	0,030044827 (±0,0191914874)	0,667	-
Lactoferrina	0,003338357 (±0,0029410787)	0,003032156 (±0,0022988145)	0,727	-	0,002230565 (±0,0010143105)	0,001723138 (±0,0019194114)	0,258	-
Citocinas em saliva								
IL-8	0,598296147 (±0,4266508550)	0,585526419 (±0,4741117474)	0,602	-	0,427631723 (±0,1880673410)	0,429623331 (±0,4737659621)	0,248	-
IL-1β	0,083566863 (±0,1073134877)	0,373449186 (±0,4909717313)	0,084	-	0,157485680 (±0,0686694357)	0,213005977 (±0,4139997005)	0,228	-
TNF-α	0,000000000 (±0,0000000000)	0,385192560 (±0,9442870724)	0,141	-	0,088803230 (±0,1933841025)	0,240775940 (±0,3214498658)	0,408	-
IL-6	0,019816354 (±0,0220103879)	0,130996866 (±0,2760759398)	0,777	-	0,041449537 (±0,0414051183)	0,105179705 (±0,1880328481)	0,959	-
Lactoferrina	0,142396376 (±0,0867958376)	0,132849310 (±0,0887012654)	0,841	-	0,184922202 (±0,0585278812)	0,173204869 (±0,1965641928)	0,16	-

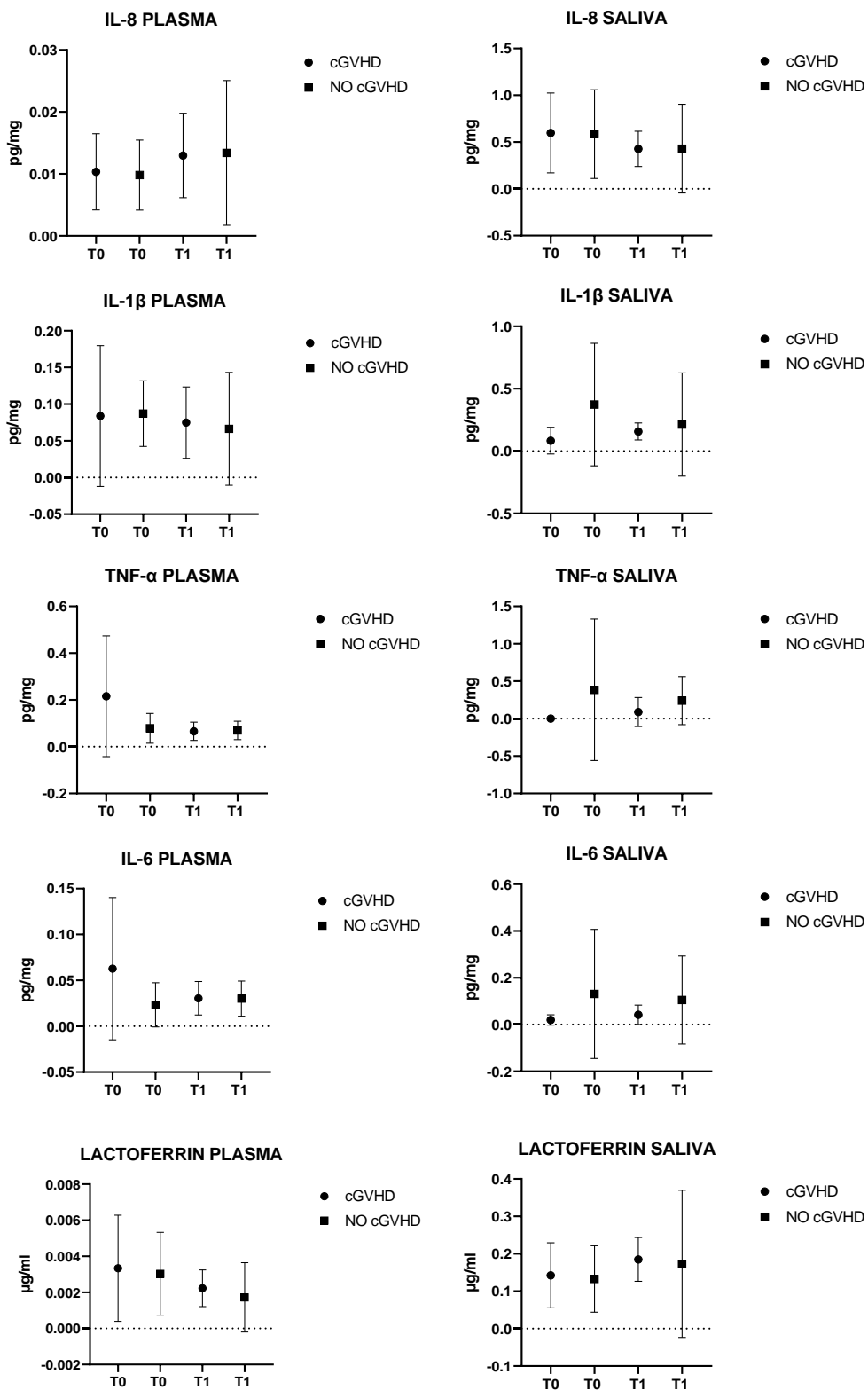


Figura 12- Comparação da expressão de citocinas entre os pacientes que desenvolveram DECHc de boca exclusivo com os pacientes que não desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

Os pacientes que desenvolveram DECHc em boca + outros órgãos apresentaram em T1, maior expressão de IL-8 ($0,018422401 \pm 0,0121301242$ X $0,012779423 \pm 0,0109094593$, $p=0,04$), IL-1 β ($0,158418359 \pm 0,0902069616$ X $0,057943136 \pm 0,0649408799$, $p= 0,045$) e IL-6 ($0,051861431 \pm 0,0115202796$ X $0,027780939 \pm 0,0179506478$, $p= 0,053$) no plasma; e IL-8 ($0,677046126 \pm 0,1287667663$ X $0,404549117 \pm 0,4535713764$, $p= 0,024$) e tendência de aumento de IL-6 ($0,345417682 \pm 0,3918661317$ X $0,070534213 \pm 0,1266976334$, $p= 0,057$) em saliva. Devido à presença de apenas 1 paciente em T0 que evoluiu com estas características de DECHc, tal análise não foi realizada para a expressão de citocinas em T0 (Tabela 9, figura 13).

Tabela 9- Comparação da expressão de citocinas em pacientes com DECHc em boca associada a outros órgãos e sem a doença

	T0		Mann-Whitney		T1		Mann-Whitney	
	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade
Citocinas em plasma								
IL-8	0,000802859 (apenas 1 paciente)	0,010221271 ($\pm 0,0053915945$)	Não avaliado	-	0,018422401 ($\pm 0,0121301242$)	0,012779423 ($\pm 0,0109094593$)	0,04	DECHc
IL-1 β	0,041826510 (apenas 1 paciente)	0,088505235 ($\pm 0,0499000925$)	Não avaliado	-	0,158418359 ($\pm 0,0902069616$)	0,057943136 ($\pm 0,0649408799$)	0,045	DECHc
TNF- α	0,015146636 (apenas 1 paciente)	0,096963255 ($\pm 0,1038486712$)	Não avaliado	-	0,078449797 ($\pm 0,0205137720$)	0,068175086 ($\pm 0,0402848386$)	0,504	-
IL-6	0,014928063 (apenas 1 paciente)	0,028164163 ($\pm 0,0342589533$)	Não avaliado	-	0,051861431 ($\pm 0,0115202796$)	0,027780939 ($\pm 0,0179506478$)	0,053	DECHc
Lactoferrina	0,003114411 (apenas 1 paciente)	0,003064323 ($\pm 0,0023587463$)	Não avaliado	-	0,001944953 ($\pm 0,0019915813$)	0,001789984 ($\pm 0,0018186351$)	0,867	-
Citocinas em saliva								
IL-8	0,254956844 (apenas 1 paciente)	0,600281570 ($\pm 0,4652523900$)	Não avaliado	-	0,677046126 ($\pm 0,1287667663$)	0,404549117 ($\pm 0,4535713764$)	0,024	DECHc
IL-1 β	0,088049987 (apenas 1 paciente)	0,350079275 ($\pm 0,4779815387$)	Não avaliado	-	0,430355195 ($\pm 0,4368482378$)	0,182017672 ($\pm 0,3764515229$)	0,08	-
TNF- α	0,000000000 (apenas 1 paciente)	0,354377155 ($\pm 0,9103553459$)	Não avaliado	-	0,245678030 ($\pm 0,2134407373$)	0,214956946 ($\pm 0,3186065568$)	0,665	-
IL-6	0,026273484 (apenas 1 paciente)	0,121844140 ($\pm 0,2662850350$)	Não avaliado	-	0,345417682 ($\pm 0,3918661317$)	0,070534213 ($\pm 0,1266976334$)	0,057	DECHc
Lactoferrina	0,123636250 (apenas 1 paciente)	0,134363480 ($\pm 0,0885749199$)	Não avaliado	-	0,198572669 ($\pm 0,1458701287$)	0,172620978 ($\pm 0,1869080126$)	0,661	-

Em negritos dados com relação estatística significativa

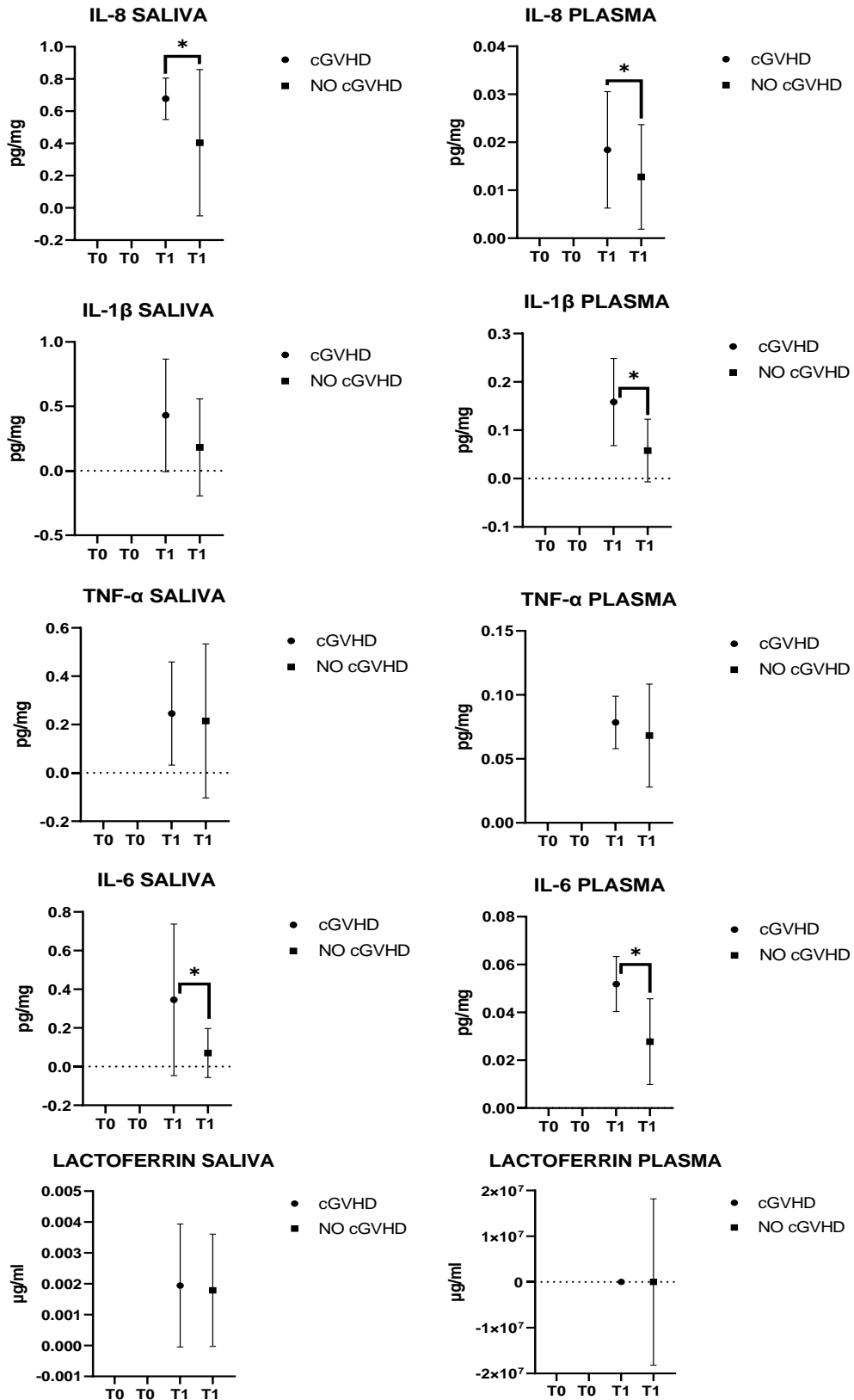


Figura 13- Comparação da expressão de citocinas entre os pacientes que desenvolveram DECHc de boca+outros órgãos com os pacientes que não desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

Na comparação entre os pacientes que desenvolveram DECHc em outros órgãos, que não incluísse o acometimento de boca, houve maior expressão de IL-6 ($0,132002014 \pm 0,0887683699$ X $0,089009620 \pm 0,1865226656$, $p=0,047$) na saliva de pacientes com DECHc, quando comparado à saliva dos que não desenvolveram DECHc em T1. Por outro lado, os pacientes que não desenvolveram DECHc, apresentaram maior expressão de Lactoferrina na saliva ($0,194189490 \pm 0,1910624106$ $0,067408325 \pm 0,0303120040$, $p= 0,016$) quando comparado aos que evoluíram com DECHc, em T1. Não foram encontradas diferenças na expressão de citocina em T0 nesta análise. Vale ressaltar que, em nossa amostra, o grupo que teve DECHc sem o envolvimento em boca foi composto predominantemente por pacientes com DECHc exclusivo de pele (Tabela 10, figura 14).

Tabela 10- Comparação da expressão de citocinas em pacientes com DECHc sem envolvimento de boca e pacientes sem a doença

	T0		Mann-Whitney		T1		Mann-Whitney	
	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade	DECHc	Não DECH	p	Amostra em superioridade
Citocinas em plasma								
IL-8	0,009542044 (±0,0024182345)	0,009898873 (±0,0057953634)	0,853	-	0,019010269 (±0,0196191731)	0,012232296 (±0,0086294878)	0,42	-
IL-1β	0,087828645 (±0,0475823764)	0,086692214 (±0,0508601882)	0,711	-	0,039610125 (±0,0266556577)	0,073062011 (±0,0774499332)	0,519	-
TNF-α	0,037308186 (±0,0111973456)	0,098462996 (±0,1058711002)	0,195	-	0,053548510 (±0,0308563735)	0,072173433 (±0,0398406716)	0,334	-
IL-6	0,025115068 (±0,0169124336)	0,027878647 (±0,0348869777)	0,579	-	0,033160680 (±0,0157754475)	0,029524892 (±0,0194791136)	0,39	-
Lactoferrina	0,005322109 (±0,0002881835)	0,002885704 (±0,0023095702)	0,094	-	0,001221918 (±0,0011284662)	0,001917109 (±0,0018992433)	0,553	-
Citocinas em saliva								
IL-8	0,267201008 (±0,0381202814)	0,613649753 (±0,4702754310)	0,124	-	0,296369878 (±0,0832097466)	0,453062947 (±0,4741424492)	0,725	-
IL-1β	0,286232541 (±0,2870180493)	0,344481949 (±0,4872535135)	0,847	-	0,085726148 (±0,0524411658)	0,225820179 (±0,4112024375)	0,651	-
TNF-α	0,000000000 (±0,0000000000)	0,369142870 (±0,9268719891)	0,239	-	0,145843569 (±0,2308537362)	0,230590165 (±0,3216761103)	0,957	-
IL-6	0,145264010 (±0,2054343331)	0,115910374 (±0,2691995987)	0,923	-	0,132002014 (±0,0887683699)	0,089009620 (±0,1865226656)	0,047	DECHc
Lactoferrina	0,088746028 (±0,0236573859)	0,137717966 (±0,0893006233)	0,386	-	0,067408325 (±0,0303120040)	0,194189490 (±0,1910624106)	0,016	Não DECHc

Em negritos dados com relação estatística significante

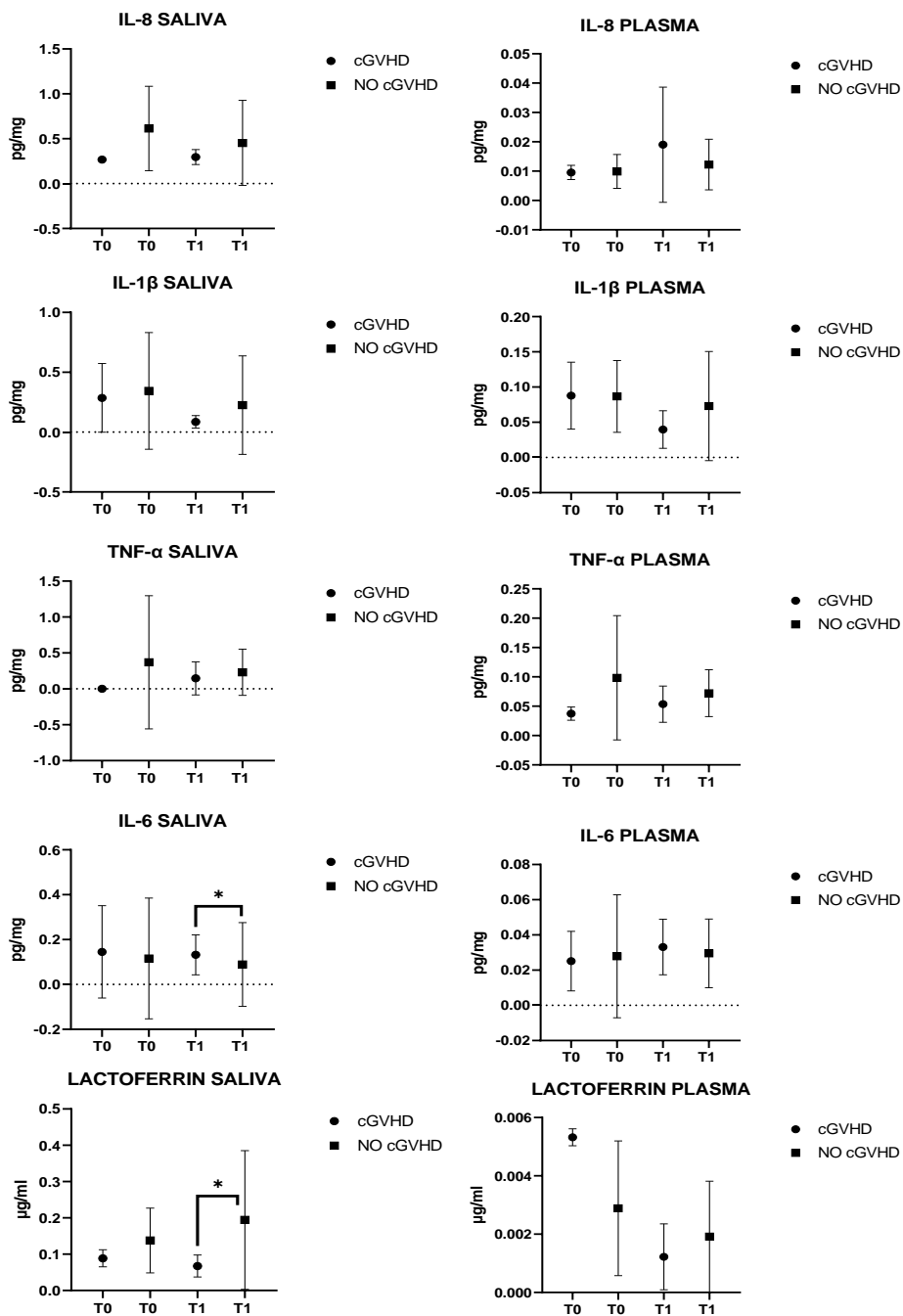


Figura 14- Comparação da expressão de citocinas entre os pacientes que desenvolveram DECHc em outros órgãos, mas sem o acometimento em boca, com os pacientes que não desenvolveram DECHc (Teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm avaliado biomarcadores da DECHc. A grande maioria utiliza-se de amostras de plasma para pesquisar polimorfismos (Hyvärinen et al., 2017; Martínez-Laperche et al., 2018) e quantificar mediadores inflamatórios (Pinto et al., 2022; Pratt et al., 2013). Marcadores celulares tem sido isolados a partir do plasma (Kuzmina et al., 2013; Li et al., 2010) e tecido (Dander et al., 2009; Malard et al., 2014). Apesar da avaliação de marcadores em plasma de pacientes com e sem DECHc (sem discriminação do órgão envolvido), a literatura tem mostrado a existência de biomarcadores associados a fenótipos e locais específicos da doença. Podem ser citados como exemplo o desenvolvimento de bronquiolite obliterante associado a baixos níveis séricos de CC16 (proteína secretora de células claras) (Mattsson et al., 2005), envolvimento esclerodérmico associado a anti-dsDNA e erupção cutânea liquenóides associada a sBAFF sérico (Fujii et al., 2008). Pesquisas de biomarcadores para DECHc ocular em lágrimas identificaram associação entre IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8 e características clínicas da doença (Hu et al., 2020; Jung et al., 2015; Nair et al., 2018). Em conjunto, estes achados suportaram a hipótese de que o envolvimento oral pela DECHc poderia ter biomarcadores específicos que seriam expressos mais abundantemente na saliva, quando comparado ao plasma. Apesar disso, poucos foram os estudos que avaliaram a expressão de marcadores salivares no contexto da DECHc oral (Bassim et al., 2012; Devic et al., 2014; Fall-Dickson et al., 2010; Yong et al., 2021). Tais estudos, propuseram avaliação transversal em pacientes com DECHc oral, com coletas em um único tempo, utilizando-se de controles sem DECHc oral (Bassim et al., 2012; Devic et al., 2014), voluntários saudáveis (Fall-Dickson et al., 2010) e pacientes transplantados sem DECHc (Yong et al., 2021). Somente este último trabalho comparou pacientes com envolvimento de boca exclusivo, boca e outros órgãos, somente outros órgãos (Yong et al., 2021) e expressão de citocinas em plasma e saliva, comparações também realizadas no atual estudo.

O presente trabalho se diferencia dos estudos prévios por apresentar um momento de coleta anterior ao desenvolvimento de DECHc (T0), além da coleta no momento do diagnóstico (T1). Adicionalmente, a que sabemos, não há outro trabalho avaliando amostras coletadas no momento do diagnóstico e antes do início do tratamento imunossupressor, o que pode alterar a expressão de mediadores inflamatórios nas amostras (Paczesny et al., 2015).

1. Dados demográficos

Dentre os 41 pacientes incluídos, 13 desenvolveram DECHc (31%). Outros trabalhos tem reportado incidências semelhantes, entre 30 e 50% (Arai et al., 2015a; Arora et al., 2016; Fall-Dickson et al., 2019; Im et al., 2020). No grupo de pacientes que desenvolveram DECHc foi encontrado um maior número de transplantes haploidênticos em detrimento de transplantes aparentados idênticos no grupo “Não DECHc”. O Transplante haploidêntico é um fato de risco para desenvolvimento de DECHc amplamente descrito na literatura (Arai et al., 2015a). A predominância de pacientes do sexo masculino no grupo “DECHc” (84,61% x 53,57%) associada a maior incidência de TCTH com doadores do sexo feminino para o masculino, também encontra amplo respaldo na literatura (Arai et al., 2015a; Flowers et al., 2011).

2. Classificação da DECHc

Segundo os dados relatados pelo “Center for International Blood and Marrow Transplant Research” (CIBMTR), a ocorrência de DECHc quiescente (38% dos casos) e “de novo” (33%) são mais prevalentes. No presente trabalho verificamos uma predominância de DECHc “de novo” (46,15%) seguida da forma quiescente (23,08%) e progressiva (23,08%). Adicionalmente, no atual trabalho, 61,53% dos pacientes que desenvolveram DECHc apresentavam envolvimento oral, em concordância a incidência de DECHc oral apresentada na literatura (45% a 83%) (Dyer et al., 2018; Flowers et al., 2002; Mays et al., 2013; Yong et al., 2021). Acreditamos que a prevalência de diagnósticos de DECHc “de novo” em nossa amostra, associado a alta incidência de acometimento oral pela DECHc, se deva à presença de um cirurgião dentista integrando a equipe multiprofissional envolvida no atendimento periódico destes pacientes, resultando no diagnóstico precoce dessa condição. Importante relatar que o acometimento oral leve e assintomático pode passar despercebido na ausência de um exame bucal minucioso.

Em nosso estudo, encontramos maior frequência da forma leve da doença (61,54%) quando comparado aos dados do CIBMTR (42%). A mediana de dias até o desenvolvimento de DECHc neste trabalho foi de 258 (47-764), ou seja, desenvolviam mais tardiamente quando em comparação com os dados apresentados pelo CIBMTR (mediana de 150 dias). Acreditamos que tais diferenças se devam ao maior número de pacientes transplantados com doenças

benignas, característico do perfil deste centro transplantador. Estes pacientes podem utilizar imunossuppressores por mais tempo após o transplante, diferentemente dos pacientes com doenças malignas, que muitas vezes necessitam de uma retirada precoce visando diminuir o risco de recaída da doença. O uso de imunossupressor prolongado em pacientes com doenças malignas prejudica o efeito “enxerto versus leucemia ou tumor”, no qual o sistema imunológico do doador contribui para a eliminação da doença subjacente (Balassa et al., 2019). Um maior tempo de imunossupressão ou uso de profilaxia para DECH pode ser a causa do desenvolvimento mais tardio e da menor incidência e gravidade da DECHc na atual amostra.

2. Índices de Saúde Bucal

Em análise descritiva, foi observado que a condição de saúde bucal se apresentou semelhante entre os grupos avaliados, tanto no T0, quanto no T1. A exceção ocorreu com o maior PSR encontrado no T0 e maior número de sextantes com doença periodontal no grupo de pacientes que desenvolveram a DECHc.

Em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo foi observada uma importante incidência de patologias orais em pacientes no pré TCTH (Reis et al., 2022). Tais achados são ratificados por outros estudos (Elad et al., 2003; Hansen et al., 2021; Yamagata et al., 2006). A associação entre doença periodontal e DECHc também tem sido investigada, porém associação de causa-efeito não está definida. Até o momento, acredita-se que tal fenômeno possa estar relacionada à limitação da higiene oral por alterações bucais na vigência de DECHc (dor, limitação de abertura, alterações salivares e etc) (Mester et al., 2020). A imunossupressão e o atraso na reconstituição imunológica associados à DECHc podem predispor tais pacientes a piores desfechos na doença periodontal (Pattni et al., 2000). Adicionalmente a DECHc oral pode se expressar através de inflamação gengival persistente (Elad et al., 2021).

Brand e colaboradores testaram a relação entre história de DECHc e variáveis de saúde bucal (sangramento gengival, patologias dentárias, sensibilidade dentária ao teste térmico e limitação de abertura bucal), havendo encontrando significância somente com a variável limitação de abertura bucal (Brand et al., 2009).

O CPOD encontrado no estudo é concordante com o apresentado pela população brasileira na faixa de 35 a 44 anos de idade. Os resultados preliminares do último Levantamento

Nacional de Saúde Bucal (SB Brasil) realizado no ano de 2022 mostrou um CPOD médio de 11,2 para esta faixa etária.

Observamos que pacientes que desenvolveram DECHc apresentavam maior frequência de higiene oral classificada como insatisfatória em T0 (40% X 11,11%) e em T1 (8,33% X 6,25%). Em estudo anterior incluindo pacientes transplantados no mesmo serviço de TCTH em que foi realizado o trabalho atual, foi observado que 13 de 33 pacientes avaliados (40%) apresentavam higiene oral insatisfatória no pré transplante, mesmo índice encontrado no T0 do “Grupo DECHc” (Reis et al., 2022). Um maior risco de carie neste grupo de pacientes pode ser explicado pelos fatores de risco inerentes à DECHc oral. Castellarin e colaboradores avaliaram 21 pacientes no momento do diagnóstico da DECHc (com mediana de 5,4 meses pós TCTH) e em tempo posterior (com mediana de 22 meses pós TCTH). Foi observado deterioração importante da condição bucal ao longo do tempo do estudo. Quase metade dos participantes (10 pacientes) foram diagnosticados com novas cáries extensas e 8 pacientes tiveram 4 ou mais dentes afetados. Pacientes com DECHc oral que estavam livres de cárie na primeira avaliação desenvolveram extensas áreas de cárie cervical e proximal (Castellarin et al., 2012).

Identificamos um aumento do fluxo salivar nos pacientes do Grupo “DECHc”, quando comparados ao grupo sem DECHc. A literatura aponta para achados contrários, ou seja, diminuição de fluxo salivar e presença de xerostomia em pacientes com desenvolvimento da DECHc (Elad et al., 2021; Nagler and Nagler, 2004). Apesar de tal relação ser amplamente descrita, outros trabalhos não encontraram diferença entre fluxo salivar de pacientes com e sem DECH oral (Bassim et al., 2015, 2012). O dano às glândulas salivares provavelmente varia dependendo da intensidade do condicionamento e dos níveis concomitantes de linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias (Devic et al., 2014). O tempo de evolução da DECHc provavelmente é fator importante no volume final e na qualidade da saliva produzida. A predominância da forma leve da doença, o tempo da evolução da doença e o perfil dos pacientes transplantados podem ter papel em tal achado.

3. Expressão de citocinas inflamatórias e a DECHc

A análise estatística evidenciou uma maior expressão de algumas citocinas inflamatórias na saliva comparado ao plasma, tanto em T0 (IL-8, IL-1 β e lactoferrina), quanto em T1 (IL-8, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina). A maior expressão de citocinas em saliva foi mantida mesmo quando

os grupos “DECHc” e “Não DECHc” foram avaliados separadamente. Houve correlação significativa e positiva entre a expressão de IL-6 em T0 e IL-1 β , IL-6 e LF em T1 entre plasma e saliva. Os pacientes que desenvolveram DECHc (seja localizado, sistêmico ou ambos) apresentaram maior expressão de IL-8 e IL-6 salivar e de IL-6 sérica no momento do diagnóstico. Os pacientes que apresentaram DECHc em boca e outros órgãos apresentaram o mesmo padrão de citocinas em saliva (maior expressão de IL-8 e IL-6) além de maiores níveis de IL-8, IL-1 β e IL6 em plasma. Quando avaliados os pacientes que apresentaram DECHc em qualquer órgão sem o envolvimento da cavidade oral, apenas o aumento de IL-6 em saliva foi significativo, comparado aos que não apresentaram DECHc. Por outro lado, os pacientes que apresentaram DECH exclusiva em boca, não apresentaram diferença significativa no momento do diagnóstico da complicação na expressão de nenhuma citocina, seja em saliva, ou plasma. Tal padrão, refuta a hipótese inicial do trabalho, sendo observado alta quantificação de citocinas em amostras de saliva em pacientes com DECHc, independentemente do sítio envolvido pela doença.

Acreditamos que tais resultados possam estar associados ao momento da coleta das amostras de plasma e saliva (T1 do “Grupo DECHc”). Tais coletas foram realizadas imediatamente após o diagnóstico da DECHc. Apesar de não haver estudos avaliando o comportamento das citocinas inflamatórias em plasma e saliva ao longo do desenvolvimento da DECHc, há estudos no contexto da DECH aguda que mostram uma elevação precoce da expressão de citocinas em saliva, antes mesmo do diagnóstico. Mais tardiamente, após o desenvolvimento dos sinais clínicos, ocorre elevação de citocinas séricas (Resende et al., 2013, 2012). É possível que coletas mais tardias ao diagnóstico pudessem apresentar maiores quantificações de citocinas em plasma. Estes achados alertam para saliva como potencial material para diagnóstico precoce e monitoramento do status inflamatório e resposta terapêutica.

A maior expressão exclusiva de IL-6 na saliva de pacientes com DECHc sem envolvimento oral em nosso estudo, pode ser um indicativo claro da sensibilidade da saliva para esse fim. Dentre esses pacientes, a grande maioria eram casos de DECHc exclusivo de pele, ou seja, um evento localizado em pele não foi suficiente para apresentar elevação de citocina detectável em plasma, mas foi em saliva. A ausência de maior expressão de citocina em saliva em nossos casos de DECHc exclusivo de boca, pode parecer controverso, mas se justifica no

fato de que, nossos casos de boca eram iniciais e identificados por lesões em mucosa, sem necessariamente apresentar envolvimento de glândula. Mesmo que localizada a extensão do envolvimento na derme, foi claramente maior do que o da mucosa oral em nossos pacientes. Reforçando essa hipótese, o aumento da expressão de IL-8 em plasma dependeu do envolvimento sistêmico da doença (mais de um órgão).

A maior quantificação de citocinas inflamatórias em saliva observada neste estudo apresenta concordância com o trabalho desenvolvido por Novak e colaboradores. Neste estudo foram incluídos 20 pacientes com Doença de Behçet, 6 pacientes com estomatite aftosa recorrente e 10 pacientes saudáveis como controle. À semelhança da DECHc, a doença de Behçet consiste em uma entidade inflamatória crônica, multissistêmica que pode acometer mucosa oral, genital, pele e articulações. Ao avaliar a expressão de citocinas em plasma e saliva dos pacientes incluídos, os autores observaram maior expressão em saliva em detrimento da quantificação nas amostras séricas. Também encontraram correlação positiva entre os dois tipos de amostra. Das 12 citocinas medidas na saliva, as mais prevalentes foram IL-1b, IL-2, IL-8, IL-10 e TNF- α estando presentes em todas as 37 (100%) amostras em contraste com o soro onde a mais prevalente foi a IL-8, presente em 94,4% das amostras. Semelhantemente aos nossos achados, a quantificação das citocinas salivares IL-8, IL-1 β e TNF- α apresentou-se aumentada mesmo na ausência do envolvimento oral, em comparação com pacientes controle saudáveis (Novak et al., 2021).

Semelhantemente, Jönsson e colaboradores estudaram pacientes com dor neuropática, uma condição somatossensorial que consiste na desregulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. O estudo contou com 13 pacientes com a doença e 13 pacientes saudáveis. 71 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram avaliados em saliva, plasma e líquido. Quando comparado os pacientes com e sem a doença houve diferença estatística na expressão de 17 citocinas e quimiocinas, das quais 8 estavam aumentadas em saliva, 5 aumentadas em plasma, 2 diminuídas em plasma e 2 diminuídas em líquido. Dentre as 5 citocinas com maior significância, 3 foram detectadas na saliva (MIP-1 α , IL-1 β , TSLP) e 2 no plasma (IL-6, IL-1RA). Tal achado corrobora com o potencial de detecção de biomarcadores inflamatórios relacionados a doenças inflamatórias sistêmicas em amostras de saliva (Jönsson et al., 2021). Outro estudo avaliou associações entre citocinas salivares e plasmáticas em idosos

cognitivamente normais. Os níveis médios de todas as citocinas foram maiores na saliva em comparação com o plasma (Parkin et al., 2023).

Observamos também em nossos resultados maior expressão de IL-1 β e lactoferrina em amostras de plasma e de IL-8 na saliva em T0, quando comparado ao T1. Acreditamos que tal achado se deva à presença da doença de base a ser tratada pelo TCTH e à terapia sistêmica anterior ao transplante, uma vez que o TCTH representa um tratamento de última linha para diversas doenças. Pacientes onco-hematológicos, por exemplo, passaram por diversos ciclos de quimioterapias anteriores ao TCTH. Em tais pacientes, espera-se que o status inflamatório inicial seja maior em T0, quando comparado a um tempo tardio pós transplante sem complicações associadas. Tal hipótese foi ratificada ao se analisar separadamente os pacientes do “Grupo DECHc” e “Não DECHc”. Apenas amostras do “Grupo Não DECHc” apresentou maior expressão de citocinas inflamatórias em T0 quando comparado com T1. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre a expressão de citocinas em T0 e T1 no “Grupo DECHc”, ou seja, altos níveis de citocinas foram observados tanto no pré transplante quanto no momento do diagnóstico da DECHc. Aparentemente, houve uma redução do status inflamatório no momento tardio pós-transplante no grupo sem DECHc, o que não aconteceu nos pacientes que desenvolveram a complicação.

A aumentada expressão de IL-6, IL-8 em plasma e saliva, IL-1 β em plasma e a menor expressão de lactoferrina salivar no momento do diagnóstico da DECHc, quando comparado aos pacientes que não desenvolveram DECHc, encontra respaldo na literatura. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que pode ser produzida pela maioria das células, com predomínio de produção por monócitos e macrófagos (Scheller et al., 2011). A sinalização clássica de IL-6 resulta na fosforilação de STAT3, que é crítica para o desenvolvimento de DECHc (Flynn et al., 2016) e tem sido sugerida como preditora da presença da doença (Kennedy et al., 2014; Lu et al., 2008). Nas células T, esta via conduz a expressão do fator de transcrição ROR γ t e a geração de produtos gênicos característicos da diferenciação de Th17/Tc17 (Serody and Hill, 2012). Linfócitos Th17/Tc17 e ROR γ T tem sido observados em locais acometidos pela DECHc (Betts et al., 2015; Brüggem et al., 2014). A IL-6 apresentou-se aumentada no plasma e na saliva quando avaliados todos os pacientes que desenvolveram DECHc e no recorte de pacientes que desenvolveram DECHc de boca e outros órgãos. Apresentou-se aumentada também em saliva de pacientes com DECHc de outros órgãos sem envolvimento oral. Em concordância com estes

achados, outros trabalhos tem associado polimorfismos no promotor da IL-6 e desenvolvimento de DECHc (Cavet et al., 2001; Cullup et al., 2003; Dickinson et al., 2004; Laguila Visentainer et al., 2005; Mullighan et al., 2004; Stark et al., 2003), quantificação de IL-6 sérica e desenvolvimento de DECHc (Barak et al., 1995; Dander et al., 2009; Fujii et al., 2008; Wang et al., 2011; Yong et al., 2021) e maior quantificação de IL-6 salivar em pacientes com DECHc (Fall-Dickson et al., 2010; Yong et al., 2021). Fall-Dickson e colaboradores também encontraram associação entre a quantificação de IL-6 salivar e presença de lesões orais (eritema e ulcera) (Fall-Dickson et al., 2010).

A IL-8 é um quimioatraente potente que está possivelmente relacionada à migração direta de efetores celulares para os órgãos-alvo da DECHc. (Bickel, 1993; Deeg, 2013). Apenas um trabalho descreveu sua presença sérica em quadros de DECHc (Dander et al., 2009), porém diversas publicações tem identificado sua expressão na DECH aguda, em complicações no pós transplante (Dole et al., 2018; Levine et al., 2012; Paczesny et al., 2009; Schots et al., 2003) e na DECHc ocular em amostras de lagrima (Hu et al., 2020).

A ação da IL-1 β tem sido classicamente reportada na primeira fase da fisiopatologia da DECHc, tendo papel na ativação de células apresentadoras de antígenos do hospedeiro, que estimulam as células T do enxerto. Potencializa, em conjunto com outras citocinas, a diferenciação de linfócitos Th17 envolvidos no desenvolvimento da doença (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Bettelli et al., 2006; Harrington et al., 2005; Wilson et al., 2007). Adicionalmente, as células mieloides (monócitos, macrófagos e neutrófilos) envolvidas na resposta inflamatória da DECHc secretam fatores solúveis (TNF α , IL-1 β e IL-6) que são importantes condutores da fibrose característica da DECHc (Gordon and Taylor, 2005; Wynn and Ramalingam, 2012). A literatura tem relatado presença de polimorfismos associados a IL-1 α e IL-1 β predispondo a um maior risco de desenvolvimento de DECHc (Cullup et al., 2003; Hyvärinen et al., 2017; Martínez-Laperche et al., 2018). Maiores níveis séricos de IL-1 β tem sido associadas à presença da doença (Barak et al., 1995; Pinto et al., 2022). Na saliva de pacientes com DECHc oral, Bassin e colaboradores verificaram diminuição da proteína antagonista do receptor de IL-1 (Bassin et al., 2012). Fall-Dickson e colaboradores identificaram aumento de IL-1 α , que se correlacionou com a intensidade de xerostomia relatada pelos pacientes do estudo (Fall-Dickson et al., 2010).

A lactotransferrina é uma glicoproteína de ligação ao ferro encontrada em altas concentrações nas secreções epiteliais, principalmente no leite humano, podendo ser encontrado também nas lágrimas, saliva e nos grânulos secundários de neutrófilos. Possui propriedades antimicrobianas (de Araújo and Giugliano, 2001; Arnold et al., 2002), desempenha papel na ativação do sistema imune por meio da ativação de macrófagos (Kell et al., 2020) e tem papel imunomodulador, como inibidora da expressão de IL-8 (Elass et al., 2002), inibidora da migração de células de Langerhans e supressão de inflamações alérgicas na pele (Kimber et al., 2002; Ward et al., 2002). Elevada lactoferrina salivar tem sido descrita na Síndrome de Sjögren (Ryu et al., 2006) e em pacientes submetidos ao TCTH (Imanguli et al., 2007). Resultados conflitantes foram publicados mostrando aumento (Bassim et al., 2012) e diminuição (Devic et al., 2014) da lactoferrina salivar em pacientes com DECHc oral. Tais achados motivaram os autores a incluir tal avaliação no presente estudo. Em nossos resultados, observamos expressão significativamente menor de lactoferrina salivar em pacientes que tiveram DECHc sistêmica sem envolvimento oral. Tal resultado se alinha com os achados de Bassim e colaboradores. Adicionalmente, o papel protetivo da lactoferrina contra a DECH foi verificado no trabalho publicado por Inoue e colaboradores que trataram com sucesso um caso de DECH aguda grave refratária a primeira linha de tratamento e que evoluiu com resolução após uso de lactoferrina administrada por via oral (Inoue et al., 2001).

O trabalho publicado por Yong e colaboradores foi o único encontrado que avaliou citocinas inflamatórias em plasma e saliva concomitantemente em pacientes com DECHc. A quantificação de IL-6 e IL-10 apresentaram-se aumentadas tanto no plasma, quanto na saliva no envolvimento oral exclusivo e oral associado a outros órgãos. Neste último grupo, houve também aumento de IL-23 sérico. Pacientes com DECHc sem envolvimento oral apresentaram alterações de expressão de citocinas apenas em plasma (aumento de IL-4, IL-23 e diminuição de TGF- β). Tal padrão mostra que o envolvimento sistêmico parece ser mais expresso em plasma e um envolvimento local mais expresso em saliva, contrariamente ao que verificamos no presente estudo. Tais discordâncias podem ser explicadas por eventual diferença no momento da coleta das amostras, apesar de não estar claro em qual momento as amostras foram coletadas no estudo de Yong e colaboradores. Outra diferença metodológica entre os trabalhos foi a correção da quantidade de citocinas inflamatórias pela quantidade de proteínas totais. O perfil de gravidade da DECHc também não foi especificado. No presente estudo, 83% dos

pacientes possuíam DECHc leve, o que pode ter influenciado na menor expressão de citocinas em plasma. Adicionalmente, Yong e colaboradores não realizaram avaliação da expressão das citocinas inflamatórias comparando os dois tipos de amostra (plasma e saliva) (Yong et al., 2021). Nossos achados precoces de citocina em saliva de pacientes com DECHc sem envolvimento oral sugere a saliva como fluido sensível e correlacionado aos eventos inflamatórios sistêmicos, o que é reforçado pela maior expressão de citocinas na saliva quando comparada ao plasma, independente da presença ou não de DECHc.

Neste estudo foi optado por normalizar as concentrações de citocinas salivares e séricas com base na quantificação de proteínas totais. Tal decisão foi baseada na grande variação de fluxo salivar e a diferença na concentração de proteínas totais nas diferentes amostras. A dificuldade de produção de saliva pode estar relacionada à utilização de medicamentos, hidratação, e pode não ser um efeito direto da DECHc. Tais variações poderiam contribuir para a obtenção de amostras mais ou menos concentradas em citocinas e proteínas. Adicionalmente, observamos maior concentração de proteínas totais em plasma tanto no T0 (8314,9133±906,39563) X 1684,7696±885,50828, p<0,0001) quanto no T1 (8100,79352±1361,587363 X 1624,62561±844,005795, p<0,0001). Tal estratégia tem sido adotada em outros trabalhos (Costantino et al., 2022; Ichikawa et al., 2007; Larra et al., 2023; Novak et al., 2021).

A dificuldade em realizar um estudo observacional com coletas anteriores ao desenvolvimento de uma doença heterogênea que se desenvolve tardiamente. As condições multifatoriais do paciente transplantado que podem influenciar na expressão de citocinas, o limitado número de pacientes, as diferentes apresentações da DECHc e a necessidade de seguimento longitudinal da expressão de citocinas no cenário do transplante são limitações deste estudo, que podem ser minimizadas com a realização de estudos multicêntricos e coletas seriadas de plasma e saliva.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Este estudo foi inédito em avaliar a expressão de citocinas inflamatórias concomitantemente em amostras de plasma e saliva, em diferentes tempos (pré TCTH, no momento do diagnóstico da DECHc e no D+360 dias) em pacientes que desenvolveram ou não a Doença do Enxerto contra o hospedeiro crônica. Com base nos resultados encontrados podemos concluir que:

- As expressões de IL-8, IL-1 β e Lactoferrina no pré-transplante e de IL-8, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina no pós-transplante foram maiores em saliva, do que em plasma;
- A comparação de citocina entre plasma e saliva incluindo apenas os pacientes que não desenvolveram DECHc apresentou maior expressão de IL-8, IL-1 β e Lactoferrina no pré-transplante e de IL-8, IL-1 β e lactoferrina no pós-transplante em saliva;
- A comparação de citocina entre plasma e saliva incluindo apenas os pacientes que desenvolveram DECHc apresentou, no pré-transplante maior expressão de IL-8 e Lactoferrina na saliva; e de TNF no plasma. No pós-transplante, observou-se maior expressão de IL-8, IL-1 β , IL-6 e lactoferrina em saliva quando comparado aos níveis séricos;
- Houve correlação significativa e positiva entre plasma e saliva para IL-8, IL-1 β e IL-6 no pré-TCTH e para IL-1 β , IL-6 e lactoferrina no pós-transplante;
- As amostras de plasma apresentaram maior expressão de IL-1 β e lactoferrina no pré-TCTH, do que nos pós-transplante. Enquanto na saliva, a IL-8 foi mais expressa em T0 do que em T1;
- No grupo “Não DECHc”, as amostras de plasma apresentaram maior expressão de IL-1 β no pré-TCTH, do que nos pós-transplante. Enquanto na saliva a IL-1 β e IL-8 foram mais expressas em T0 do que em T1;
- No grupo “DECHc”, não houve diferença significativa na expressão de citocinas inflamatórias entre T0 com T1;
- Os pacientes que desenvolveram DECHc apresentaram maior expressão de IL-6 em plasma e de IL-8 e IL-6 em saliva no diagnóstico da doença, quando comparado aos que não desenvolveram DECHc. Por outro lado, uma maior expressão de TNF- α em saliva foi observada no pré-transplante de pacientes que não desenvolveram DECHc;
- Os pacientes que desenvolveram DECHc exclusivo em boca não apresentaram diferença na expressão de citocina, quando comparado aos pacientes sem DECHc;

-Os pacientes com DECHc em boca + outros órgãos apresentaram no pós transplante maior expressão de IL-8, IL-1 β e IL-6 em plasma e de IL-8 e IL-6 em saliva do que os que não desenvolveram DECHc;

-Os casos de DECHc em outros órgãos sem o envolvimento de boca (compostos majoritariamente por DECHc de pele exclusivo) apresentaram no pós transplante maior expressão de IL-6 em saliva e menor expressão de lactoferrina em saliva, quando comparados aos casos “não-DECHc”.

Estudos com maior número de pacientes são necessários para confirmar o potencial da saliva como fluido para o diagnóstico precoce, monitoramento prognóstico e terapêutico na DECHc.

REFERÊNCIAS

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9. <https://doi.org/10.1038/ni1496>.

Alexander KA, Flynn R, Lineburg KE, Kuns RD, Teal BE, Olver SD, et al. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2014;124:4266–80. <https://doi.org/10.1172/JCI75935>.

Alho AC, Kim HT, Chammas MJ, Reynolds CG, Matos TR, Forcade E, et al. Unbalanced recovery of regulatory and effector T cells after allogeneic stem cell transplantation contributes to chronic GVHD. *Blood* 2016;127:646–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-672345>.

Allen JL, Fore MS, Wooten J, Roehrs PA, Bhuiya NS, Hoffert T, et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood* 2012;120:2529–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-438911>.

Allen JL, Tata PV, Fore MS, Wooten J, Rudra S, Deal AM, et al. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood* 2014;123:2108–15. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-533562>.

Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Rev* 2019;33:43–50. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.11.003>.

Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing Incidence of Chronic Graft-versus-Host Disease in Allogeneic Transplantation – A Report from CIBMTR. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015a;21:266–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.10.021>.

Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015b;21:266–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.10.021>.

de Araújo AN, Giugliano LG. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol* 2001;1:25. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-25>.

Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Valenti P, Seganti L, et al. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res* 2002;53:153–8. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(01\)00197-8](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(01)00197-8).

Arora M, Cutler CS, Jagasia MH, Pidala J, Chai X, Martin PJ, et al. Late Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2016;22:449–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.10.018>.

Arora M, Pidala J, Cutler CS, Chai X, Kurland B, Jacobsohn DA, et al. Impact of Prior Acute GVHD on Chronic GVHD Outcomes: a Chronic Graft versus Host Disease Consortium Study. *Leukemia* 2013;27:1196–201. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.292>.

Bachier CR, Aggarwal SK, Hennegan K, Milgroom A, Francis K, Dehipawala S, et al. Epidemiology and Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease Post-Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A US Claims Analysis. *Transplant Cell Ther* 2021;27:504.e1-504.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2020.12.027>.

Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2009;15:1628–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.07.004>.

Baird K, Steinberg SM, Grkovic L, Pulanic D, Cowen EW, Mitchell SA, et al. National Institutes of Health (NIH) Chronic GVHD Staging in Severely Affected Patients: Organ and Global Scoring Correlate with Established Indicators of Disease Severity and Prognosis. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2013;19:632–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.01.013>.

Balassa K, Danby R, Rocha V. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. *Br J Hosp Med* 2019;80:33–9. <https://doi.org/10.12968/hmed.2019.80.1.33>.

Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk Lymphoma* 1995;17:169–73. <https://doi.org/10.3109/10428199509051718>.

Bassim CW, Ambatipudi KS, Mays JW, Edwards DA, Swatkoski S, Fassil H, et al. Quantitative Salivary Proteomic Differences in Oral Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Clin Immunol* 2012;32:1390–9. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9738-4>.

Bassim CW, Fassil H, Mays JW, Edwards D, Baird K, Steinberg SM, et al. Oral Disease Profiles in Chronic Graft versus Host Disease. *J Dent Res* 2015;94:547–54. <https://doi.org/10.1177/0022034515570942>.

Bertinetto FE, Dall’Omo AM, Mazzola GA, Rendine S, Berrino M, Bertola L, et al. Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 2006;33:375–84. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2006.00630.x>.

Betelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8. <https://doi.org/10.1038/nature04753>.

Betts BC, Sagatys EM, Veerapathran A, Lloyd MC, Beato F, Lawrence HR, et al. CD4+ T cell STAT3 phosphorylation precedes acute GVHD, and subsequent Th17 tissue invasion correlates with GVHD severity and therapeutic response. *J Leukoc Biol* 2015;97:807–19. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A1114-532RR>.

Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 1993;64:456–60.

Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, Tsakiris DA, Jeanneret C, Pober JS, et al. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet Lond Engl* 2002;359:2078–83. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08907-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08907-9).

Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12:443–58. <https://doi.org/10.1038/nri3212>.

Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, Jones LA, Chaney C, Seropian S, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest* 2015a;125:2677–89. <https://doi.org/10.1172/JCI81229>.

Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, Jones LA, Chaney C, Seropian S, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest* 2015b;125:2677–89. <https://doi.org/10.1172/JCI81229>.

Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Lange A. Recipient interferon-gamma 3/3 genotype contributes to the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005;90:425–6. <https://doi.org/10.3324/%x>.

Brand HS, Bots CP, Raber-Durlacher JE. Xerostomia and chronic oral complications among patients treated with haematopoietic stem cell transplantation. *Br Dent J* 2009;207:E17–E17. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2009.977>.

Brice L, Gilroy N, Dyer G, Kabir M, Greenwood M, Larsen S, et al. Predictors of quality of life in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation survivors. *J Psychosoc Oncol* 2021;39:534–52. <https://doi.org/10.1080/07347332.2020.1870644>.

Brüggen M-C, Klein I, Greinix H, Bauer W, Kuzmina Z, Rabitsch W, et al. Diverse T-cell responses characterize the different manifestations of cutaneous graft-versus-host disease. *Blood* 2014;123:290–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-514372>.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007;7:633–43. <https://doi.org/10.1038/nri2133>.

Carpenter PA, Kitko CL, Elad S, Flowers MED, Gea-Banacloche JC, Halter JP, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: V. The 2014 Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015;21:1167–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.03.024>.

Castellarin P, Stevenson K, Biasotto M, Yuan A, Woo S-B, Treister NS. Extensive dental caries in patients with oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2012;18:1573–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.04.009>.

Castro CE, Koss MA, López ME. Biochemical markers of the periodontal ligament. *Med Oral Organo Of Soc Espanola Med Oral Acad Iberoam Patol Med Bucal* 2003;8:322–8.

Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:1594–600. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.5.1594>.

Chen Y, Sakurai K, Maeda S, Masui T, Okano H, Dewender J, et al. Integrated Collection of Stem Cell Bank Data, a Data Portal for Standardized Stem Cell Information. *Stem Cell Rep* 2021;16:997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.014>.

Cheng Y-SL, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. *Clin Transl Med* 2014;3:3. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-3>.

Cheon J, Lee YJ, Jo J-C, Kweon K, Koh S, Min YJ, et al. Late complications and quality of life assessment for survivors receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Support Care Cancer* 2021;29:975–86. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05572-0>.

Choi J, Ziga ED, Ritchey J, Collins L, Prior JL, Cooper ML, et al. IFN γ R signaling mediates alloreactive T-cell trafficking and GVHD. *Blood* 2012;120:4093–103. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403196>.

Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 2004;103:2410–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2073>.

Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2017;23:211–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.09.023>.

Copelan EA, Chojecki A, Lazarus HM, Avalos BR. Allogeneic hematopoietic cell transplantation; the current renaissance. *Blood Rev* 2019;34:34–44. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.001>.

Costantino E, Castell SD, Harman MF, Palencia MCP-, Actis AB. Salivary Proinflammatory Cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF Decrease With Age 2022;2022.04.25.489450. <https://doi.org/10.1101/2022.04.25.489450>.

Cullup H, Dickinson AM, Cavet J, Jackson GH, Middleton PG. Polymorphisms of interleukin-1alpha constitute independent risk factors for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2003;122:778–87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04510.x>.

Cutler C, Kim HT, Bindra B, Sarantopoulos S, Ho VT, Chen Y-B, et al. Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. *Blood* 2013;122:1510–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495895>.

Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andrè V, et al. Interleukin-17–Producing T-Helper Cells as New Potential Player Mediating Graft-Versus-Host Disease in Patients Undergoing Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Transplantation* 2009;88:1261–72. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181bc267e>.

Deeg JF H Joachim Deeg, Kenneth R Cooke, James Ferrara, Kenneth R Cooke, H Joachim, editor. *Graft vs. Host Disease*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2013. <https://doi.org/10.1201/b14165>.

DeFilipp Z, Alousi AM, Pidala JA, Carpenter PA, Onstad LE, Arai S, et al. Nonrelapse mortality among patients diagnosed with chronic GVHD: an updated analysis from the Chronic GVHD Consortium. *Blood Adv* 2021;5:4278–84. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004941>.

Delaney TA, Morehouse C, Brohawn PZ, Groves C, Colonna M, Yao Y, et al. Type I IFNs Regulate Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Chronic Cutaneous Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 2016;197:42–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502190>.

Devic I, Shi M, Schubert MM, Lloid M, Izutsu KT, Pan C, et al. Proteomic analysis of saliva from patients with oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2014;20:1048–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.031>.

Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E, Eurobank members. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 2004;127:479–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05216.x>.

Dole N, Luebbering N, Gloude NJ, Lane A, Davies SM. IL-8 Levels Early after Bone Marrow Transplant are Associated with Later Complications of Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:S431–2. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.12.516>.

Dourado VC, Rapp GE. Periodontal screening survey in dental students of the Federal University of Bahia using PSR. *Rev ABENO* 2004;4:42–7. <https://doi.org/10.30979/rev.abeno.v4i1.1500>.

Duarte RF, Labopin M, Bader P, Basak GW, Bonini C, Chabannon C, et al. Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2019. *Bone Marrow Transplant* 2019;54:1525–52. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0516-2>.

Dyer G, Brice L, Schifter M, Gilroy N, Kabir M, Hertzberg M, et al. Oral health and dental morbidity in long-term allogeneic blood and marrow transplant survivors in Australia. *Aust Dent J* 2018;63:312–9. <https://doi.org/10.1111/adj.12627>.

Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Champlin RE, Loberiza FR, Ringdén O, et al. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2004;22:4872–80. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.02.189>.

Eissner G, Lindner H, Behrends U, Kölch W, Hieke A, Klauke I, et al. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10. *Transplantation* 1996;62:819–27. <https://doi.org/10.1097/00007890-199609270-00020>.

Elad S, Aljitiawi O, Zadik Y. Oral Graft-Versus-Host Disease: A Pictorial Review and a Guide for Dental Practitioners. *Int Dent J* 2021;71:9–20. <https://doi.org/10.1111/idj.12584>.

Elad S, Garfunkel AA, Or R, Michaeli E, Shapira MY, Galili D. Time limitations and the challenge of providing infection-preventing dental care to hematopoietic stem-cell transplantation patients. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer* 2003;11:674–7. <https://doi.org/10.1007/s00520-003-0499-8>.

Elass E, Masson M, Mazurier J, Legrand D. Lactoferrin Inhibits the Lipopolysaccharide-Induced Expression and Proteoglycan-Binding Ability of Interleukin-8 in Human Endothelial Cells. *Infect Immun* 2002;70:1860–6. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1860-1866.2002>.

Fall-Dickson JM, Mitchell SA, Marden S, Ramsay ES, Guadagnini J-P, Wu T, et al. Oral Symptom Intensity, Health-Related Quality of Life, and Correlative Salivary Cytokines in Adult Survivors of Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2010;16:948–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.01.017>.

Fall-Dickson JM, Pavletic SZ, Mays JW, Schubert MM. Oral Complications of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2019;2019:lgz007. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgz007>.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host

disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2005;11:945–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.09.004>.

Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 2011;117:3214–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302109>.

Flowers MED, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2015;125:606–15. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-551994>.

Flowers MED, Parker PM, Johnston LJ, Matos AVB, Storer B, Bensinger WI, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002;100:415–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0011>.

Flynn R, Du J, Veenstra RG, Reichenbach DK, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, et al. Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* 2014;123:3988–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-562231>.

Flynn R, Paz K, Du J, Reichenbach DK, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, et al. Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. *Blood* 2016;127:2144–54. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-678706>.

Forcade E, Kim HT, Cutler C, Wang K, Alho AC, Nikiforow S, et al. Circulating T follicular helper cells with increased function during chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2016;127:2489–97. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-688895>.

Fujii H, Cuvelier G, She K, Aslanian S, Shimizu H, Kariminia A, et al. Biomarkers in newly diagnosed pediatric-extensive chronic graft-versus-host disease: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008;111:3276–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-106286>.
Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Adv Dent Res* 2011;23:375–80. <https://doi.org/10.1177/0022034511420434>.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM198910263211707>.

Gooptu M, Antin JH. GVHD Prophylaxis 2020. *Front Immunol* 2021;12:605726. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.605726>.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>.

Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med* 2014;371:339–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMSa1311707>.

Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica* 2020;105:2716–29. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.245688>.

Hakim FT, Memon S, Jin P, Imanguli MM, Wang H, Rehman N, et al. Upregulation of IFN-Inducible and Damage-Response Pathways in Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 2016;197:3490–503. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601054>.

Hamilton BK. Updates in chronic graft-versus-host disease. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2021;2021:648–54. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000301>.

Hamilton BK, Liu Y, Hemmer MT, Majhail N, Ringden O, Kim D, et al. Inferior Outcomes with Cyclosporine and Mycophenolate Mofetil after Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2019;25:1744–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.05.019>.

Hannon M, Lechanteur C, Lucas S, Somja J, Seidel L, Belle L, et al. Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Transfusion (Paris)* 2014;54:353–63. <https://doi.org/10.1111/trf.12279>.

Hansen HJ, Estilo C, Owosho A, Solano AK, Randazzo J, Huryn J, et al. Dental status and risk of odontogenic complication in patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer* 2021;29:2231–8. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05733-1>.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32. <https://doi.org/10.1038/ni1254>.

Hayashida J-N, Nakamura S, Toyoshima T, Moriyama M, Sasaki M, Kawamura E, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:115–23. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.100>.

Heidegger S, van den Brink MRM, Haas T, Poeck H. The Role of Pattern-Recognition Receptors in Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2014;5:337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00337>.

Hu B, Qiu Y, Hong J. Tear cytokine levels in the diagnosis and severity assessment of ocular chronic graft-versus-host disease(GVHD). *Ocul Surf* 2020;18:298–304.
<https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.12.005>.

Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998;28:2598–602.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199808\)28:08<2598::AID-IMMU2598>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08<2598::AID-IMMU2598>3.0.CO;2-K).

Hyvärinen K, Ritari J, Koskela S, Niittyvuopio R, Nihtinen A, Volin L, et al. Genetic polymorphism related to monocyte-macrophage function is associated with graft-versus-host disease. *Sci Rep* 2017;7:15666. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15915-3>.

Ichikawa T, Matsunaga K, Minakata Y, Yanagisawa S, Ueshima K, Akamatsu K, et al. Possible Impact of Salivary Influence on Cytokine Analysis in Exhaled Breath Condensate. *Anal Chem Insights* 2007;2:117739010700200000. <https://doi.org/10.4137/117739010700200007>.

Im A, Rashidi A, Wang T, Hemmer M, MacMillan ML, Pidala J, et al. Risk Factors for Graft-versus-Host Disease in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation Using Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2020;26:1459–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2020.05.001>.

Imanguli MM, Atkinson JC, Harvey KE, Hoehn GT, Ryu OH, Wu T, et al. Changes in salivary proteome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2007;35:184–92. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.10.009>.

Inamoto Y, Jagasia M, Wood WA, Pidala J, Palmer J, Khara N, et al. Investigator feedback about the 2005 NIH diagnostic and scoring criteria for chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:532–8. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.225>.

Inoue M, Okamura T, Yasui M, Sakata N, Yagi K, Kawa K. Lactoferrin for gut GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:1091–2. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703283>

J Charles C, H Charles A. Periodontal screening and recording. vol. 22. 1994.

Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO. [Effect of protection of the spleen during total body irradiation on the blood in rabbit]. *Rev Hematol* 1953;8:515–32.

Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015a;21:389-401.e1. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.001>.

Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host

Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015b;21:389-401.e1. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.001>.

Jaglowski SM, Blazar BR. How ibrutinib, a B-cell malignancy drug, became an FDA-approved second-line therapy for steroid-resistant chronic GVHD. *Blood Adv* 2018;2:2012–9. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018013060>.

Janin A, Deschaumes C, Daneshpouy M, Estaquier J, Micic-Polianski J, Rajagopalan-Levasseur P, et al. CD95 engagement induces disseminated endothelial cell apoptosis in vivo: immunopathologic implications. *Blood* 2002;99:2940–7. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.8.2940>.

Jönsson M, Gerdle B, Ghafouri B, Bäckryd E. The inflammatory profile of cerebrospinal fluid, plasma, and saliva from patients with severe neuropathic pain and healthy controls—a pilot study. *BMC Neurosci* 2021;22:6. <https://doi.org/10.1186/s12868-021-00608-5>.

Jung JW, Han SJ, Song MK, Kim T-I, Kim EK, Min YH, et al. Tear Cytokines as Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015;21:2079–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.08.020>.

Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med* 2017;242:459–72. <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>.

Kanate AS, Majhail NS, Savani BN, Bredeson C, Champlin RE, Crawford S, et al. Indications for Hematopoietic Cell Transplantation and Immune Effector Cell Therapy: Guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020;26:1247–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2020.03.002>.

Kawano Y, Kim HT, Matsuoka K-I, Bascug G, McDonough S, Ho VT, et al. Low telomerase activity in CD4+ regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;118:5021–30. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362137>.

Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol* 2020;11:1221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.

Kelly A, Trowsdale J. Introduction: MHC/KIR and governance of specificity. *Immunogenetics* 2017;69:481–8. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-0986-6>.

Kennedy GA, Varelias A, Vuckovic S, Le Texier L, Gartlan KH, Zhang P, et al. Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1451–9. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71017-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71017-4).

Khaddour K, Hana CK, Mewawalla P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood* 2014;124:2034–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-571125>.

Kim DH, Lee NY, Sohn SK, Baek JH, Kim JG, Suh JS, et al. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 2005;79:1615–22. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000159792.04757.d4>.

Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Headon DR, Bhushan M, Griffiths CEM. Lactoferrin: influences on Langerhans cells, epidermal cytokines, and cutaneous inflammation. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 2002;80:103–7. <https://doi.org/10.1139/o01-227>.

Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming Growth Factor (TGF)- β 1-producing Regulatory T Cells Induce Smad-mediated Interleukin 10 Secretion That Facilitates Coordinated Immunoregulatory Activity and Amelioration of TGF- β 1-mediated Fibrosis. *J Exp Med* 2003;198:1179–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20030917>.

Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 2014;14:377–91. <https://doi.org/10.1038/nri3667>.

Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2016;71:22–51. <https://doi.org/10.1111/prd.12110>.

Kohrt HE, Tian L, Li L, Alizadeh AA, Hsieh S, Tibshirani RJ, et al. Identification of gene microarray expression profiles in patients with chronic graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Immunol Orlando Fla* 2013;148:124–35. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.04.013>.

Krenger W, Blazar BR, Holländer GA. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117:6768–76. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334623>.
Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 2016a;374:43–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506002>.

Kröger N, Solano C, Wolschke C, Bandini G, Patriarca F, Pini M, et al. Antilymphocyte Globulin for Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* 2016b;374:43–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506002>.

Kuzmina Z, Krenn K, Petkov V, Körmöczi U, Weigl R, Rottal A, et al. CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood* 2013;121:1886–95. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435008>.

Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, Dutra Marques SB, Vigorito AC, Penteadó Aranha FJ, et al. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine* 2005;32:171–7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.09.002>.

Lakshmi PVSD, Sridevi E, Sai Sankar AJ, Manoj Kumar MG, Sridhar M, Sujatha B. Diagnostic perspective of saliva in insulin dependent diabetes mellitus children: An in vivo study. *Contemp Clin Dent* 2015;6:443–7. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.169844>.

Larra MF, Capellino S, Schwendich E, von Haugwitz L, Reinders J, Wascher E. Immediate and Delayed Salivary Cytokine Responses during Repeated Exposures to Cold Pressor Stress. *Neuroimmunomodulation* 2023;30:81–92. <https://doi.org/10.1159/000529625>.

Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2013;121:3274–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-465658>.

Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn J-Y, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406–14. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.2.406>.

Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2003;9:215–33. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2003.50026>.

Levine JE, Logan BR, Wu J, Alousi AM, Bolaños-Meade J, Ferrara JLM, et al. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood* 2012;119:3854–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403063>.

Li Q, Zhai Z, Xu X, Shen Y, Zhang A, Sun Z, et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk Res* 2010;34:1158–68. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.03.017>.

Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38:610–6. <https://doi.org/10.1902/jop.1967.38.6.610>.

Lu SX, Alpdogan O, Lin J, Balderas R, Campos-Gonzalez R, Wang X, et al. STAT-3 and ERK 1/2 phosphorylation are critical for T-cell alloactivation and graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:5254–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-147322>.

Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 2012;39:683–93. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.09.005>.

Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14:641–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.03.005>.

Malard F, Bossard C, Brissot E, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, et al. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:539–44. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.215>.

Martinez-Cibrian N, Zeiser R, Perez-Simon JA. Graft-versus-host disease prophylaxis: Pathophysiology-based review on current approaches and future directions. *Blood Rev* 2021;48:100792. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100792>.

Martínez-Laperche C, Buces E, Aguilera-Morillo MC, Picornell A, González-Rivera M, Lillo R, et al. A novel predictive approach for GVHD after allogeneic SCT based on clinical variables and cytokine gene polymorphisms. *Blood Adv* 2018;2:1719–37. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011502>.

Martires KJ, Baird K, Citrin DE, Hakim FT, Pavletic SZ, Cowen EW. Localization of Sclerotic-type Chronic Graft-vs-Host Disease to Sites of Skin Injury. *Arch Dermatol* 2011;147:1081–6. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2011.226>.

Mattsson J, Remberger M, Andersson O, Sundberg B, Nord M. Decreased serum levels of clara cell secretory protein (CC16) are associated with bronchiolitis obliterans and may permit early diagnosis in patients after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2005;79:1411–6. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000158354.39635.ab>.

Mays JW, Fassil H, Edwards DA, Pavletic SZ, Bassim CW. Oral chronic graft-versus-host disease: current pathogenesis, therapy, and research. *Oral Dis* 2013;19:327–46. <https://doi.org/10.1111/odi.12028>.

Mester A, Irimie AI, Tanase A, Tranca S, Campian RS, Tomuleasa C, et al. Periodontal disease might be a risk factor for graft versus host disease. A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020;147:102878. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102878>.

Mielcarek M, Furlong T, O'Donnell PV, Storer BE, McCune JS, Storb R, et al. Posttransplantation cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease after HLA-matched mobilized blood cell transplantation. *Blood* 2016;127:1502–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-672071>.

Miklos D, Cutler CS, Arora M, Waller EK, Jagasia M, Pusic I, et al. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood* 2017;130:2243–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-793786>.

Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005;105:2973–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3660>.

Miller JP, Perry EH, Price TH, Bolan CD, Karanes C, Boyd TM, et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2008;14:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.05.018>.

Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008;98. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604149>.

Mullighan C, Heatley S, Doherty K, Szabo F, Grigg A, Hughes T, et al. Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004;77:587–96. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000111769.45088.a2>.

Nagler RM, Nagler A. The Molecular Basis of Salivary Gland Involvement in Graft- vs. -Host Disease. *J Dent Res* 2004;83:98–103. <https://doi.org/10.1177/154405910408300203>.

Nair S, Vanathi M, Mahapatra M, Seth T, Kaur J, Velpandian T, et al. Tear inflammatory mediators and protein in eyes of post allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients. *Ocul Surf* 2018;16:352–67. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.04.007>.

Navazesh M. Methods for Collecting Saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:72–7. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x>.

Novak T, Hamed M, Bergmeier LA, Fortune F, Hagi-Pavli E. Saliva and Serum Cytokine Profiles During Oral Ulceration in Behçet's Disease. *Front Immunol* 2021;12:724900. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.724900>.

Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke K, Lathrop J, Griffith LM, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2015;21:780–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.01.003>.

Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM, Choi SW, Clouthier SG, Kuick R, et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113:273–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167098>.

Parkin GM, Kim S, Mikhail A, Malhas R, McMillan L, Hollearn M, et al. Associations between saliva and plasma cytokines in cognitively normal, older adults. *Aging Clin Exp Res* 2023;35:117–26. <https://doi.org/10.1007/s40520-022-02292-9>.

Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Duarte RF, Dufour C, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:811–7. <https://doi.org/10.1038/bmt.2017.34>.

Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, de la Cámara R, Corbacioglu S, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant* 2021;56:1651–64. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01227-8>.

Patriarca F, Skert C, Sperotto A, Zaja F, Falleti E, Mestroni R, et al. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Exp Hematol* 2006;34:389–96. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.12.011>.

Pattni R, Walsh LJ, Marshall RI, Cullinan MP, Seymour GJ, Bartold PM. Changes in the Periodontal Status of Patients Undergoing Bone Marrow Transplantation. *J Periodontol* 2000;71:394–402. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.3.394>.

Pidala J, Kurland B, Chai X, Majhail N, Weisdorf DJ, Pavletic S, et al. Patient-reported quality of life is associated with severity of chronic graft-versus-host disease as measured by NIH criteria: report on baseline data from the Chronic GVHD Consortium. *Blood* 2011;117:4651–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319509>.

Pidala J, Vogelsang G, Martin P, Chai X, Storer B, Pavletic S, et al. Overlap subtype of chronic graft-versus-host disease is associated with an adverse prognosis, functional impairment, and inferior patient-reported outcomes: a Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium study. *Haematologica* 2012;97:451–8. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.055186>.

Pinto GR, Sarmiento VA, Carvalho-Filho PC de, Fortuna VA, Costa R dos S, Conceição RR, et al. Gene expression profile of chronic oral graft-versus-host disease. *PLOS ONE* 2022;17:e0267325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267325>.

Pratt LM, Liu Y, Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Podgorny PJ, Lyon AW, et al. IL15 levels on day 7 after hematopoietic cell transplantation predict chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:722–8. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.210>.

Ramadan A, Paczesny S. Various Forms of Tissue Damage and Danger Signals Following Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Front Immunol* 2015;6:14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00014>.

Rams TE, Loesche WJ. Relationship Between Periodontal Screening and Recording Index Scores and Need for Periodontal Access Surgery. *J Periodontol* 2017;88:1042–50. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170070>.

Rangarajan H, Yassai M, Subramanian H, Komorowski R, Whitaker M, Gorski J, et al. Emergence of T cells that recognize nonpolymorphic antigens during graft-versus-host disease. *Blood* 2012;119:6354–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-401596>.

Reis T de C, Bortolotti F, Innocentini LMAR, Ferrari TC, Ricz HMA, Cunha RLG, et al. Assessment of oral health condition in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther* 2022;44:549–54. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.02.009>.

Resende RG, Abreu MHNG, de Souza LN, Silva MES, Gomez RS, Correia-Silva J de F. Association between IL1B (+3954) polymorphisms and IL-1 β levels in blood and saliva, together with acute graft-versus-host disease. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res* 2013;33:392–7. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0111>.

Resende RG, Correia-Silva JDF, Silva TA, Xavier SG, Bittencourt H, Gomez RS, et al. Saliva and blood interferon gamma levels and IFNG genotypes in acute graft-versus-host disease. *Oral Dis* 2012;18:816–22. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01955.x>.

Riega-Torres JCL, Villarreal-Gonzalez AJ, Ceceñas-Falcon LÁ, Salas-Alanis JC. [Sjögren's syndrome (SS), a review of the subject and saliva as a diagnostic method]. *Gac Med Mex* 2016;152:371–80.

Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991;138:447.

Rozmus J, Schultz KR, Wynne K, Kariminia A, Satyanarayana P, Krailo M, et al. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2011;17:1804–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.05.011>.

Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatol Oxf Engl* 2006;45:1077–86.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei212>.

Sarantopoulos S, Cardones AR, Sullivan KM. How I treat refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2019;133:1191–200. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-785899>.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878–88.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>.

Schots R, Kaufman L, Van Riet I, Ben Othman T, De Waele M, Van Camp B, et al. Proinflammatory cytokines and their role in the development of major transplant-related complications in the early phase after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 2003;17:1150–6.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402946>.

Serody JS, Hill GR. The IL-17 Differentiation Pathway and Its Role in Transplant Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2012;18:S56–61.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.10.001>.

She K, Gilman AL, Aslanian S, Shimizu H, Krailo M, Chen Z, et al. Altered Toll-like receptor 9 responses in circulating B cells at the onset of extensive chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2007;13:386–97.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2006.12.441>.

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 J Med* 1980;69:204–17. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90380-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90380-0).

Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121–35.
<https://doi.org/10.3109/00016356408993968>.

Skert C, Damiani D, Michelutti A, Patriarca F, Arpinati M, Fili C, et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:729–37. <https://doi.org/10.1038/bmt.2009.80>.

Sorrer ML, Leisenring W, Deeg HJ, Martin PJ, Storb R. Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2005;11:814–5.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.05.016>.

Srinivasan M, Flynn R, Price A, Ranger A, Browning JL, Taylor PA, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* 2012;119:1570–80. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-364414>.

Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH, Taylor PR, Proctor SJ, Middleton PG. Tumour necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2003;76:1742–9. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000092496.05951.D5>.

Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, Maiwald A, Döhler D, Oßmann D, et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy* 2015;17:473–86. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.005>.

Thomas ED, Lichte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM195709122571102>.

Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res* 2014;102:258–69. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu062>.

Viel DO, Tsuneto LT, Sossai CR, Lieber SR, Marques SBD, Vigorito AC, et al. IL2 and TNFA gene polymorphisms and the risk of graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Scand J Immunol* 2007;66:703–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02021.x>.

Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H-P, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood* 2009;114:702–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208983>.

Wachsmuth LP, Patterson MT, Eckhaus MA, Venzon DJ, Gress RE, Kanakry CG. Post-transplantation cyclophosphamide prevents graft-versus-host disease by inducing alloreactive T cell dysfunction and suppression. *J Clin Invest* 2019;129:2357–73. <https://doi.org/10.1172/JCI124218>.

Wang Jing, Wang X-B, Wang Jian, Liu H-L, Geng L-Q, Ding K-Y, et al. [Detection of Th17/treg cell-associated cytokines in peripheral blood of patients with graft-versus-host disease and its clinical significance]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2011;19:422–6.

Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 2002;80:95–102. <https://doi.org/10.1139/o01-214>.

Weisdorf D, Cooley S, Wang T, Trachtenberg E, Haagenson MD, Vierra-Green C, et al. KIR Donor Selection: Feasibility in Identifying better Donors. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2019;25:e28–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.08.022>.

Williams KM, Inamoto Y, Im A, Hamilton B, Koreth J, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2020 Etiology and Prevention Working Group Report. *Transplant Cell Ther* 2021;27:452–66. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2021.02.035>.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7. <https://doi.org/10.1038/ni1497>.

Wolff D, Schleuning M, Von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, Stadler M, et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.05.011>.

Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199–210. <https://doi.org/10.1038/nri1027>.

World Health Organization, editor. *Oral health surveys: basic methods*. 5th edition. Geneva: World Health Organization; 2013.

Wu T, Young JS, Johnston H, Ni X, Deng R, Racine J, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013;191:488–99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300657>.

Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:245–57. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012;18:1028–40. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.

Yamagata Kenji, Onizawa K, Yoshida H, Yamagata Kaori, Kojima Y, Koike K, et al. Dental management of pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Pediatr Hematol Oncol* 2006;23:541–8. <https://doi.org/10.1080/08880010600814187>.

Yong X, Peng Y, Liu Z, Li Q, Lai Y, Wu T, et al. Analysis of serum and salivary cytokines among patients with oral cGVHD after Allo-HSCT. *Oral Dis* 2021;27:1320–4. <https://doi.org/10.1111/odi.13658>.

Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med Berl Ger* 2011;89:833–45. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0767-x>.

Zhao D, Young JS, Chen Y-H, Shen E, Yi T, Todorov I, et al. Alloimmune response results in expansion of autoreactive donor CD4⁺ T cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;186:856–68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002195>.

Zhu X, Tang B, Sun Z. Umbilical cord blood transplantation: Still growing and improving. *Stem Cells Transl Med* 2021;10:S62–74. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0495>.

APÊNDICES

APENDICES

Apêndice 1- Descrição das características diagnósticas, distintivas e comuns dos órgão/sistemas para a doença do enxerto contra o hospedeiro

FICHA INICIAL IDENTIFICAÇÃO

NUMERO DE ENTRADA NA PESQUISA(PREENCHER DEPOIS) _____

Paciente: _____ DATA: _____

Registro: _____ Peso: _____ NASCIMENTO _____

CONDICIONAMENTO: _____

DOENÇA DE BASE: _____ DATA DA INFUSAO DE MEDULA: _____

TIPO DO TRANSPLANTE

- () ALOGENICO APARENTADO IDENTICO () ALOGENICO NÃO APARENTADO MISMATCH
() ALOGENICO APARENTADO MISMATCH () HAPLO-IDENTICO
() ALOGENICO NÃO APARENTADO IDENTICO

FONTE DE CELULA

- () MEDULA ÓSSEA () SANGUE PERIFÉRICO

PROFILAXIA PARA DECH: _____

COMORBIDADES

COMORBIDADE	COMORBIDADE

Medicamentos em uso (posologia):

MEDICAMENTO	VIA DE ADMINSTRAÇÃO	DOSE

FICHA DE COLETA EM DIFERENTES TEMPOS (IMPRIMIR UMA PARA CADA TEMPO)

Paciente: _____ DATA: _____

1. TEMPO DO TRANSPLANTE:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Antes do Preparo Odontológico | <input type="checkbox"/> Diagnóstico de DECHc em boca |
| <input type="checkbox"/> Pré-Condicionamento imediato | <input type="checkbox"/> Diagnóstico de DECHc sistêmico + boca |
| <input type="checkbox"/> Pior grau de Mucosite | <input type="checkbox"/> 1 ano após TMO |
| <input type="checkbox"/> Diagnóstico de DECHa | <input type="checkbox"/> 2 anos pós TMO |
| <input type="checkbox"/> Diagnóstico de DECHc sistêmico | |

2. TRATANDO INFECÇÃO?: SIM NÃO

SE SIM: QUAL _____

NÃO IDENTIFICADA

3. FEBRE NAS ULTIMAS 48 HORAS: SIM NÃO

4. HEMOCULTURA OU PCR SANGUE POSITIVA NAS ULTIMAS 48 HS: SIM NÃO

SE SIM: QUAL MICROORGANISMO OU PCR _____

(SE BACTERIA OU FUNGO COLOCAR O NOME DIRETO, SE PCR COLOCAR PCR E O VIRUS)

5. MEDICAMENTOS EM USO

MEDICAMENTO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	DOSE e numero de vezes ao dia (ex. 50mg; 3x/dia)	DATA DE INICIO

*via de administração: VO: via Oral; IV: intra-venoso; TP: tópico pele; TO: tópio oral

6.ÍNDICE - PSR

O índice PSR envolve 3 etapas:

1. Exame em pelo menos 6 sítios em cada dente
2. Caminhar com a sonda pelo sulco gengival
3. Quando houver apenas 1 dente este será o representante do sextante
4. Registrar o pior código em cada sextante

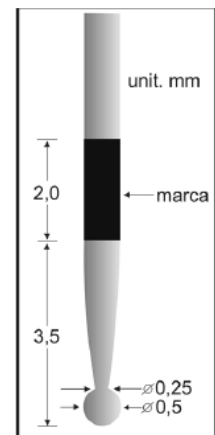
⇒ vá para o próximo sextante quando registrar código 4

⇒ adicione o símbolo * quando achar anormalidades clínicas (mobilidade, recessões gengivais \geq a 3,5mm, envolvimento de bifurcações, problemas mucogengivais)

⇒ códigos 0, 1 e 2: tratamento por clínico geral
 ⇒ códigos 3 e 4 : tratamento por periodontista

Quadro 1. RPS: Critérios clínicos de definição de escores

Escore	RPS
0	Nenhum sinal de doença periodontal - Faixa colorida totalmente visível
1	Sangramento gengival até 30s após a sondagem suave - faixa colorida totalmente visível
2	Cálculo supra e/ou subgengival e/ou margens restauradoras mal adaptadas - faixa colorida totalmente visível
3	Bolsa periodontal que permite a introdução da sonda no sulco (bolsa de 4 a 5 mm) - faixa colorida da sonda parcialmente visível
4	Bolsa periodontal que permite maior introdução da sonda no sulco (bolsa profunda de 6 mm ou mais) - faixa colorida não visível
*	Anormalidade clínica associada aos demais escores - comprometimento de furca, mobilidade, alterações mucogengivais e/ou recessão gengival na área colorida da sonda (maior que 3,5 mm a partir da junção amelo-cementária).



7.ÍNDICE DE PLACA (SILNESS-LOE)

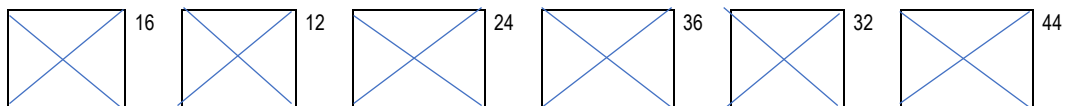
Pontuar as 4 faces de cada dente:

0- Ausência de placa

1- Placa reconhecida somente ao passar uma sonda na superfície do dente

2- Placa vista a olho nu

3- Placa abundante (1-2mm de espessura)



8.CPO-D

C: _____; P: _____; O: _____ CPOD: _____

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

0- Hígido; C- Cariado; R- Restaurado sem cárie; A- Ausente

.Cariado: descalcificação com cavidade; restaurados com carie ou infiltração; raízes residuais

.Ausentes: dentes ausentes que foram extraídos

.Restaurador/obturados: material restaurador em boas condições

09.DOR (VAS)

Cavidade oral: _____(0a10)

Orofaringe/garganta: _____(0a10)



10.DECH

10.1DECHc Sistêmico (Critério NIH 2014):

Pele =

Pulmão =

Fígado =

Articulação=

Olho =

TGI =

Genital =

Classificação global= _____

10.2 BOCA (classificação-Não se aplica para agudo) :

Classificação:

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
MOUTH <i>Lichen planus-like features present:</i> Yes No	No symptoms	Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake
	<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>			

11.COLETA DE SANGUE E SALIVA

VOLUME DE SALIVA COLHIDA (PESO):_____ g em 5 minutos

Horário da coleta:_____

Conseguiu respeitar o Jejum? ()Sim ()Não

O sangue foi colhido no mesmo horário da saliva? ()Sim ()Não

Se não foi colhido, colocar horário da coleta:_____

Qual acesso para coleta de sangue? ()PERIFÉRICO ()CATÉTER

Observações (colocar informações que julgar importante relativa a coleta e manuseio do material):_____

Apêndice 2- termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Avaliação da expressão de citocinas inflamatórias em pacientes com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica”

Número do CAAE:

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa onde você será submetido a exame clínico na boca, coleta de pequena quantidade de saliva e sangue. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento. Gostaríamos de reforçar que trata-se de uma participação voluntária, e que o(a) senhor(a) pode se recusar a participar, sem prejuízo algum em seu tratamento. Além disso, todos os dados são sigilosos, então seu nome não vai ser divulgado em momento algum.

Justificativa, hipótese e objetivos:

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas é um tratamento complexo com inúmeros efeitos secundários em todo o organismo, incluindo também a cavidade oral. Este estudo tem como hipótese a possibilidade de que pacientes submetidos a este tratamento possam apresentar maiores efeitos orais secundários (por exemplo maior atividade inflamatória da gengiva e periodonto e desenvolvimento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro), bem como avaliar se as proteínas inflamatórias encontram-se também no sangue. Este estudo tem a proposta de realizar a coleta de dados através de exame clínico da cavidade oral, pequena quantidade de saliva e sangue de pacientes que fazem seguimento no ambulatório de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP-USP). As seguintes informações serão colhidas: condição de saúde bucal (índice CPO-D), condição de saúde periodontal (índice PSR Modificado, índice de placa e gengival), aproximadamente 5mL de saliva e 5mL de sangue. Para preservar sua identidade, será usado o número de seu prontuário e seu nome não aparecerá nas avaliações de dados ou publicações.

Procedimentos:

Este estudo envolverá exame clínico da cavidade bucal onde serão colhidas informações com os índices já validados pela literatura CPO-D e PSR Modificado, Índice de placa e gengival. Para a coleta de saliva, você será solicitado a cuspir em um pote descartável por cinco minutos. A coleta do sangue será realizada pela própria equipe de enfermagem do ambulatório do TMO.

Desconfortos e riscos:

Você não deve participar deste estudo se:

- Não quiser participar do mesmo ou não assinar esse termo de consentimento livre e esclarecido.
- Por algum motivo, não puder ou não quiser realizar o exame clínico da cavidade bucal e/ou fazer a coleta de saliva e sangue

1-Cansaço durante o exame clínico: O exame clínico é realizado de forma rápida e sistemática, minimizando o esforço do paciente, porém deve ser realizado com a boca do paciente aberta, podendo causar cansaço ou desconforto.

2-Ressecamento bucal durante a coleta de saliva: como vai ser solicitado que cuspa sua saliva em um pote, pode ser que após a coleta sua boca fique mais seca. Iremos oferecer água se sentir seca.

3-Maior demora na consulta: como esta pesquisa foi encaixada em seu retorno no ambulatório do TMO, você permanecerá cerca de dez a 15 minutos a mais para a realização dos procedimentos.

4-Incomodo e discreto sangramento da gengiva: durante o exame da gengiva pequenos sangramentos podem ocorrer em áreas inflamadas, todos os cuidados serão tomados caso algum episódio de sangramento ocorra.

5-Incomodo para coleta de sangue: como é de se saber, a coleta de sangue envolve um pequeno desconforto e ansiedade para a retirada.

6-Exposição da sua identificação (quebra de sigilo): todos os cuidados serão tomados para que apenas os responsáveis pela pesquisa tenham contato com os seus dados de identificação. No entanto, mesmo que muito pouco provável, pode haver exposição acidental do seu nome e outras pessoas ficarem sabendo que participou do trabalho.

Benefícios:

- 1- Para os participantes do estudo:** todos receberão atenção odontológica e exame clínico complementar. O paciente que tiver perdido seguimento odontológico no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto será reagendado para procedimentos clínicos, se necessário, ou para manter seguimento odontológico de rotina. Também irá contribuir para o avanço em pesquisas que envolvam pacientes submetidos ao TMO com Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica.

Acompanhamento e assistência:

Os voluntários participantes deste estudo serão acompanhados durante todo período do estudo pelo cirurgião-dentista responsáveis pelo projeto em seu hospital. Para orientações e dúvidas, ligar para o Cirurgião dentista: Dr. Leandro Dorigan de Macedo; ligue a cobrar discando 904116-991481137, ou se preferir ligue (16) 36022352 (horário comercial).

Fica assegurado ao voluntário desta pesquisa, que em caso da comprovação de danos causado pela pesquisa, o mesmo receberá assistência médica e odontológica imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário pela equipe de Cirurgiões Dentistas e Médicos envolvidos neste estudo.

Sigilo e privacidade:

Com a sua concordância em participar deste estudo, você terá a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado, para a análise de dados sua identificação será feita através de um número, apenas os responsáveis pelo trabalho de seu hospital saberão qual número se refere a você.

Ressarcimento e Indenização:

Os procedimentos e avaliações a serem realizados neste estudo serão feitos durante os retornos odontológicos da rotina já estabelecidos para o tratamento do paciente, sem acarretar despesas extras para o paciente. Não haverá ressarcimento de despesas, como transporte, alimentação etc.

Entretanto, fica assegurado o direito do voluntário participante da pesquisa de interromper sua participação no estudo, sem quaisquer prejuízos ao seu tratamento odontológico ou médico.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

- A coleta de sua saliva e sangue servirá para avaliar a presença de citocinas inflamatórias e será armazenada em um biorrepositório (local aonde se armazena material biológico) na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto;
- Toda nova pesquisa a ser realizada com as amostras armazenadas de sua saliva e sangue será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);
- A cada nova pesquisa, o voluntário será consultado e receberá um novo TCLE para permissão do uso das amostras de saliva armazenadas.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico (saliva e sangue) armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado quando ou se houver modificação ou alteração das condições do biorrepositório onde a saliva estiver armazenada

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados ao Dr. Leandro Dorigan de Macedo.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores da sua Instituição:

Dr. Thiago de Carvalho Reis

Endereço: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Avenida Bandeirantes, 3.900 – Vila Monte Alegre, Campus da USP, Ribeirão Preto-SP. Telefones: (16) 988635878 (ligue a cobrar discando 904116 988635878; (16) 36022352. Ou pelo email: thiagodec.reis@gmail.com

Dr. Leandro Dorigan de Macedo

Endereço: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto: Avenida Bandeirantes, 3.900 – Vila Monte Alegre, Campus da USP, Ribeirão Preto-SP. Telefones: (16) 991481137 (ligue a cobrar discando 904116 991481137); (16) 36022352. Ou pelo email: dorigan@hcrp.usp.br

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto – HCFMRP das 08:00hs às 17:00hs na Avenida Bandeirantes, 3.900 – Vila Monte Alegre, Campus da USP, Ribeirão Preto-SP; CEP: 14049900; telefone (16) 3602-2228; e-mail: cep@hcrp.usp.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico (saliva), devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico (saliva), sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

ANEXOS

ANEXO 1- Descrição das características diagnósticas, distintivas e comuns dos órgão/sistemas para a DECH crônica.

Signs and symptoms of chronic GVHD

ORGAN OR SITE	DIAGNOSTIC <i>(Sufficient to establish the diagnosis of chronic GVHD)</i>	DISTINCTIVE* <i>(Seen in chronic GVHD, but insufficient alone to establish a diagnosis)</i>	OTHER FEATURES OR UNCLASSIFIED ENTITIES**	COMMON*** <i>(Seen with both acute and chronic GVHD)</i>
Skin	<ul style="list-style-type: none"> Poikiloderma Lichen planus-like features Sclerotic features Morphea-like features Lichen sclerosus-like features 	<ul style="list-style-type: none"> Depigmentation Papulosquamous lesions 	<ul style="list-style-type: none"> Sweat impairment Ichthyosis Keratosi pilaris Hypopigmentation Hyperpigmentation 	<ul style="list-style-type: none"> Erythema Maculopapular rash Pruritus
Nails		<ul style="list-style-type: none"> Dystrophy Longitudinal ridging, splitting or brittle features Onycholysis Pterygium unguis Nail loss (usually symmetric, affects most nails) 		
Scalp and Body Hair		<ul style="list-style-type: none"> New onset of scarring or non-scarring scalp alopecia, (after recovery from chemoradiotherapy) Loss of body hair Scaling 	<ul style="list-style-type: none"> Thinning scalp hair, typically patchy, coarse or dull (not explained by endocrine or other causes), Premature gray hair 	
Mouth	<ul style="list-style-type: none"> Lichen planus-like changes 	<ul style="list-style-type: none"> Xerostomia Mucocele Mucosal atrophy Ulcers Pseudomembranes 		<ul style="list-style-type: none"> Gingivitis Mucositis Erythema Pain

ORGAN OR SITE	DIAGNOSTIC <i>(Sufficient to establish the diagnosis of chronic GVHD)</i>	DISTINCTIVE* <i>(Seen in chronic GVHD, but insufficient alone to establish a diagnosis)</i>	OTHER FEATURES OR UNCLASSIFIED ENTITIES**	COMMON*** <i>(Seen with both acute and chronic GVHD)</i>
		<ul style="list-style-type: none"> • Cicatricial conjunctivitis • Keratoconjunctivitis sicca • Confluent areas of punctate keratopathy 	<ul style="list-style-type: none"> • Blepharitis (erythema of the eye lids with edema) 	
Genitalia	<ul style="list-style-type: none"> • Lichen planus-like features • Lichen sclerosus-like features 	<ul style="list-style-type: none"> • Erosions • Fissures • Ulcers 		
<i>Females</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Vaginal scarring or clitoral/labial agglutination 			
<i>Males</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Phimosis or urethral/meatus scarring or stenosis 			
GI Tract	<ul style="list-style-type: none"> • Esophageal web • Strictures or stenosis in the upper to mid third of the esophagus 		<ul style="list-style-type: none"> • Exocrine pancreatic insufficiency 	<ul style="list-style-type: none"> • Anorexia • Nausea • Vomiting • Diarrhea • Weight loss • Failure to thrive (infants and children)
Liver				<ul style="list-style-type: none"> • Total bilirubin, alkaline phosphatase > 2 × upper limit of normal • ALT > 2 × upper limit of normal

ORGAN OR SITE	DIAGNOSTIC (Sufficient to establish the diagnosis of chronic GVHD)	DISTINCTIVE*	OTHER FEATURES OR UNCLASSIFIED ENTITIES**	COMMON*** (Seen with both acute and chronic GVHD)
Muscles, Fascia, Joints	<ul style="list-style-type: none"> • Fasciitis • Joint stiffness or contractures secondary to fasciitis or sclerosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Myositis or polymyositis^{††} 	<ul style="list-style-type: none"> • Edema • Muscle cramps • Arthralgia or arthritis 	
Hematopoietic and Immune			<ul style="list-style-type: none"> • Thrombocytopenia • Eosinophilia • Lymphopenia • Hypo- or hyper-gammaglobulinemia • Autoantibodies (AIHA, ITP) • Raynaud's phenomenon 	

Other

- Pericardial or pleural effusions
 - Ascites
 - Peripheral neuropathy
 - Nephrotic syndrome
 - Myasthenia gravis
 - Cardiac conduction abnormality or cardiomyopathy
-

* In all cases, infection, drug effect, malignancy, or other causes must be excluded.

** Can be acknowledged as part of the chronic GVHD manifestations if diagnosis is confirmed.

*** Common refers to shared features by both acute and chronic GVHD.

[‡]BOS can be diagnostic for lung chronic GVHD only, if distinctive sign or symptom present in another organ (see text)

[†]Pulmonary entities under investigation or unclassified.

^{††}Diagnosis of chronic GVHD requires biopsy.

Abbreviation: ALT (alanine aminotransferase); PFTs (pulmonary function tests); AIHA (autoimmune hemolytic anemia); ITP (idiopathic thrombocytopenic purpura).

(Jagasia et al., 2015a)

ANEXO 2- Critérios de severidade da Doença do enxerto contra o hospedeiro

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: <input type="text"/> KPS ECOG LPS	Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN† <input type="text"/> SCORE % BSA <i>GVHD features to be scored by BSA:</i>	No BSA involved	1-18% BSA	19-50% BSA	>50% BSA
Check all that apply: Maculopapular rash/erythema Lichen planus-like features Sclerotic features Papulosquamous lesions or ichthyosis Keratosis pilaris-like GVHD				
SKIN FEATURES SCORE:	No sclerotic features		Superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)	Check all that apply: Deep sclerotic features "Hidebound" (unable to pinch) Impaired mobility Ulceration
<i>Other skin GVHD features (NOT scored by BSA)</i>				
Check all that apply: Hyperpigmentation Hypopigmentation Poikiloderma Severe or generalized pruritus Hair involvement Nail involvement Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				
MOUTH <i>Lichen planus-like features present:</i> Yes No	No symptoms	Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify): _____				

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
EYES	No symptoms	Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requirement of lubricant eye drops ≤ 3 x per day)	Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring lubricant eye drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT new vision impairment due to KCS	Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyeware to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision due to KCS
<i>Keratoconjunctivitis sicca (KCS) confirmed by ophthalmologist:</i>	Yes No Not examined			
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
GI Tract	No symptoms	Symptoms without significant weight loss* ($< 5\%$)	Symptoms associated with mild to moderate weight loss* (5-15%) OR moderate diarrhea without significant interference with daily living	Symptoms associated with significant weight loss* $> 15\%$, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation OR severe diarrhea with significant interference with daily living
Check all that apply:				
Esophageal web/proximal stricture or ring				
Dysphagia				
Anorexia				
Nausea				
Vomiting				
Diarrhea				
Weight loss $\geq 5\%$ *				
Failure to thrive				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LIVER	Normal total bilirubin and ALT or AP < 3 x ULN	Normal total bilirubin with ALT ≥ 3 to 5 x ULN or AP ≥ 3 x ULN	Elevated total bilirubin but ≤ 3 mg/dL or ALT > 5 ULN	Elevated total bilirubin > 3 mg/dL
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				
LUNGS**				
Symptom score:	No symptoms	Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O_2)
Lung score:	FEV1 $\geq 80\%$	FEV1 60-79%	FEV1 40-59%	FEV1 $\leq 39\%$
% FEV1 <input type="text"/>				
<i>Pulmonary function tests</i>				
Not performed				
<i>Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):</i>				

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
JOINTS AND FASCIA	No symptoms	Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema thought due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)

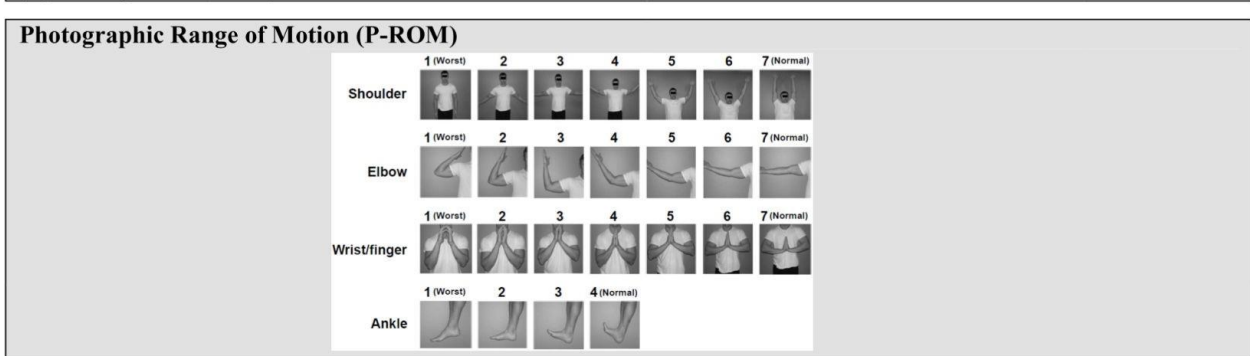
Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

GENITAL TRACT (See Supplemental figure [‡])	No signs	Mild signs [‡] and females with or without discomfort on exam	Moderate signs [‡] and may have symptoms with discomfort on exam	Severe signs [‡] with or without symptoms
Not examined				
Currently sexually active				
Yes				
No				

Abnormality present but explained entirely by non-GVHD documented cause (specify):

Other indicators, clinical features or complications related to chronic GVHD (check all that apply and assign a score to severity (0-3) based on functional impact where applicable none – 0, mild -1, moderate -2, severe – 3)			
Ascites (serositis) ___	Myasthenia Gravis ___		
Pericardial Effusion ___	Peripheral Neuropathy ___	Eosinophilia > 500/μl ___	
Pleural Effusion(s) ___	Polymyositis ___	Platelets <100,000/μl ___	
Nephrotic syndrome ___	Weight loss >5%* without GI symptoms ___	Others (specify):	

Overall GVHD Severity (Opinion of the evaluator)	<input type="checkbox"/> No GVHD	<input type="checkbox"/> Mild	<input type="checkbox"/> Moderate	<input type="checkbox"/> Severe
--	----------------------------------	-------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------



† Skin scoring should use both percentage of BSA involved by disease signs **and** the cutaneous features scales. When a discrepancy exists between the percentage of total body surface (BSA) score and the skin feature score, **OR** if superficial sclerotic features are present (Score 2), but there is impaired mobility or ulceration (Score 3), the higher level should be used for the final skin scoring.

* Weight loss within 3 months.

**Lung scoring should be performed using both the symptoms and FEV1 scores whenever possible. FEV1 should be used in the final lung scoring where there is discrepancy between symptoms and FEV1 scores.

Abbreviations: ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), KPS (Karnofsky Performance Status), LPS (Lansky Performance Status); BSA (body surface area); ADL (activities of daily living); LFTs (liver function tests); AP (alkaline phosphatase); ALT (alanine aminotransferase); ULN (normal upper limit).

‡ To be completed by specialist or trained medical providers (see Supplemental Figure).

(Jagasia et al., 2015a)

ANEXO 3- Recomendações de terapia auxiliar e cuidados de suporte da Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica em boca e tecido

Indication, Preparation*, Active agent, Concentration				Rating
Lichenoid-related symptoms/ulcers and erosions	Rinse	Clobetasol	0.5 mg/mL (0.05%)	AIa
		Budesonide	0.3 mg/mL (0.03%)	BIIa
		Dexamethasone	0.1 mg/mL (0.01%)	AIII
		Triamcinolone	1 mg/mL (0.1%)	AIII
		Tacrolimus	0.1 mg/mL (0.01%)	BIIa
		Prednisolone	3 mg/mL (0.03%)	BIII
		Clobetasol:tacrolimus 1:1	Not specified	CIII
	Gel, paste, ointment	Clobetasol gel	0.05%	AIa
		Tacrolimus ointment	0.1%	BIIa
		Fluocinonide gel	0.05%	BIII
Intralesional injection	Triamcinolone	40 mg/mL, .5 mL/cm ²	CIIb	
Mucosal pain	Rinse	Lidocaine	2%	BIII
		Kaolinite pectin-diphenhydramine-lidocaine 1:1:1	Not specified	BIII
	Not applicable	CO ₂ laser for pain relief [30]	Not applicable	CIII ^F
Dry mouth	Gel, toothpaste	Fluoride	Per manufacturer	AIb
	Rinse	Water sipping	Per need	AIII
	Gum, candy	Salivary stimulants	Per need	AIII
	Tablets	Pilocarpine	5–10 mg 3–4/d	BIIa
		Cevimeline	15–30 mg 3/d	BIII
Gastric reflux	Tablets	Proton pump inhibitor, antireflux measures		CIII

PEDIATRIC CONSIDERATIONS

Behavioral: Children often don't communicate symptoms of impaired speech, oral dryness or sensitivities, taste alteration, and dysphagia; reduced oral intake and increased drinking during eating or at night may be presenting symptoms. Specific approaches to help parents assist children with oral topical therapies may improve compliance.

Prevention of caries: Bottle drinking should not be used as a pacifier for small children and cup drinking should be introduced as early as possible. Counsel the avoidance of refined carbohydrates including juices and soft drinks.

Developmental: Fibrosis and limited mouth opening may contribute to the disruption of craniofacial growth.

Pharmacologic considerations: While oral mucosal chronic GVHD generally responds well to topical steroids or calcineurin inhibitors, these agents may produce clinically relevant systemic drug levels in infants and small children. Viscous lidocaine may reduce the gag reflex, compromise swallowing and should be used with caution. Sialogogue use has been limited in children and dosing is not established.

Orthodontic: Fixed braces should only be used after healing of acute inflammation. Specific guidelines for optimal force and pace of orthodontic management in chronic GVHD remain undefined.

^F The selection of a localized or generalized treatment depends on the extent of oral chronic GVHD.

^F Optional at centers experienced in the use of this therapy as it currently has limited availability.

(Carpenter et al., 2015)

ANEXO 4- Recomendações de terapia auxiliar e cuidados de suporte da Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica

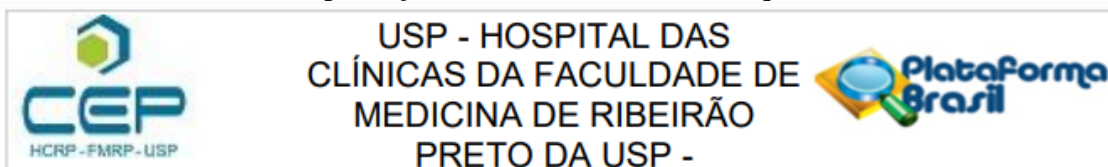
Organ System	Organ-Specific Intervention *	
	Prevention	Treatment
Skin and appendages	Photoprotection e sun avoidance and physical sunblocks (eg, protective clothing, UVA, and UVB sunscreens). Avoidance of photosensitizing agents (eg, voriconazole). Surveillance for malignancy [2,3].	For intact skin e topical emollients including urea containing products, corticosteroids, antipruritic agents, and others (eg, PUVA or narrow band UVB, calcineurin inhibitors). For erosions/ulcerations e microbiologic cultures, topical antimicrobials, protective films or other dressings, debridement, hyperbaric oxygen, wound care specialist consultation.
Mouth and oral cavity	Maintain good oral/dental hygiene. Routine dental cleaning and radiographs. Surveillance for infection and malignancy. Nutritional counseling, if needed.	Topical high and ultra-high potency corticosteroids and topical calcineurin inhibitors. Topical analgesics. Therapy for oral dryness (eg, salivary stimulants, sialogogues) and for prevention of related complications (ie, dental decay).
Eyes	Photoprotection. Surveillance for infection, cataract formation, and increased intraocular pressure.	Artificial tears, ocular ointments, topical corticosteroids or cyclosporine, punctal occlusion, humidified environment, occlusive eye wear, moisture chamber eyeglasses, cevimeline, pilocarpine, gas-permeable scleral contact lens, autologous serum, microbiologic cultures, topical antimicrobials, doxycycline.
Vulva and vagina	Surveillance for estrogen deficiency, infection (HSV, HPV, yeast, bacteria) and malignancy [3].	Water-based or silicone lubricants, topical estrogens, topical corticosteroids or calcineurin inhibitors, dilators or vibrators, surgery for extensive synechiae or obliteration, early gynecology consultation. Avoid glycerin, paraben, fragrance, and other additive products,
Gastrointestinal tract and liver	Surveillance for infection (viral, bacterial, fungal, parasites)	Rule out other potential etiologies. Dietary modification, enzyme supplementation for pancreatic insufficiency, bile salt resins, gastroesophageal reflux management, esophageal dilatation, ursodeoxycholic acid, topical glucocorticoids, limitation of ethanol intake, avoidance of hepatotoxins.
Lungs	Surveillance for infection (<i>Pneumocystis jirovecii</i> , viral, fungal, bacterial).	Rule out other potential etiologies (eg, infection, gastroesophageal reflux). Inhaled corticosteroids, bronchodilators, supplementary oxygen, pulmonary rehabilitation. Consideration of lung transplantation in appropriate candidates.
Hematopoietic	Surveillance for infection (CMV, parvovirus)	Rule out other potential etiologies (eg, drug toxicity, infection). Hematopoietic growth factors, immunoglobulin for immune cytopenias
Neurologic	Calcineurin drug level monitoring. Seizure prophylaxis as indicated, including blood pressure control, electrolyte replacement, anticonvulsants. EMG monitoring and staging in symptomatic patients taking medications known to cause neuropathy. Close monitoring of distal extremities for wounds in insensate patients.	Occupational and physical therapy to prevent falls and improve function, treatment of neuropathic syndromes with tricyclic antidepressants, SSRI, or anticonvulsants [4]. Orthotics and assistive devices (canes and walkers). Bracing, splinting or surgical release for entrapment neuropathies.
Immunologic and infectious diseases	Immunizations and prophylaxis against <i>Pneumocystis jirovecii</i> , VZV, and encapsulated bacteria based on CDC guidelines. Consider immunoglobulin replacement based on levels and recurrent infections. Surveillance for infection (viral, bacterial, fungal, atypical).	Organism-specific antimicrobial agents. Empiric parenteral broad-spectrum antibacterial coverage for fever.
Musculoskeletal	Surveillance for decreased ROM, bone densitometry, calcium levels and 25-OH vitamin D. Physical therapy, calcium, vitamin D, and bisphosphonates. Flexion-extension x-rays to look for instability.	Physical therapy, bisphosphonates for osteopenia, and osteoporosis. Spinal orthosis for instability and/or intractable pain. Walking program, resistance training, core strengthening.

SSRI indicates selective serotonin reuptake inhibitors; CDC, Centers for Disease Control.

* In general, close serial monitoring of all organ systems is recommended to promote early detection and intervention directed toward reversing or preventing progression of chronic GVHD manifestations and treatment-associated toxicities. Ancillary and supportive care therapies are commonly employed in addition to systemic GVHD treatment, although in some cases their use may circumvent the need for systemic treatment or allow doses of systemic agents to be reduced.

(Carpenter et al., 2015)

ANEXO 5- Parecer de Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PROTEÍNAS E CITOCINAS RELACIONADAS À INFLAMAÇÃO EM PACIENTES TRATADOS COM TERAPIA CELULAR

Pesquisador: THIAGO DE CARVALHO REIS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56741322.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.384.454

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo longitudinal prospectivo que incluirá 100 pacientes submetidos ao transplante alogênico de medula óssea e aos submetidos a terapia com Car T-cell em um Hospital Universitário. Os participantes da pesquisa serão acompanhados longitudinalmente e terão sangue periférico e saliva coletados nos seguintes tempos: 1-Alo-TCTH: imediatamente antes do condicionamento (T0), no pior grau de mucosite oral antes da enxertia neutrofílica (T1), no diagnóstico da DECH aguda (T2), no diagnóstico de DECH crônica (T3) e com um ano pós o transplante (T4).; 2- Car T-cell: no pré condicionamento (T1); imediatamente antes da infusão (T2); se febre nas primeiras 24 hs após infusão (T3); no D+1 pós infusão (T4); D+3 (T5); D+7 (T6); D+10 (T7); D+14 (T8) ; D+21 (T9); D+28 (T10). Nos mesmos tempos, com exceção do T3 para Car T-Cell, serão coletados também os índices de saúde bucal, score de dor medido pela Escala Visual Analógica (EVA) e medida de fluxo salivar não estimulado. Para o pior grau de mucosite oral, será considerado a avaliação diária destas lesões e a expectativa do dia de pior grau de mucosite em função do protocolo e condicionamento realizado. A avaliação clínica sempre irá sobrepor a expectativa teórica do dia de pior grau de mucosite oral. Com isso, em casos de o paciente não apresentar lesões de mucosite oral clinicamente detectáveis, em teoria, o suposto o pior de grau de mucosite será estimado e os dados serão coletados para todas as variáveis. Os cuidados odontológicos para os pacientes seguirão o protocolo padrão definido na

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.384.454

instituição.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil proteômico e de citocinas inflamatórias em sangue e saliva no pré tratamento com terapia celular (alo-TCTH e Car T-Cell) e no desenvolvimento de complicações inflamatórias. No alo-TCTH: mucosite oral, DECHa e DECHc; no Car T-Cell: no período de resposta inflamatória aguda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Presentes no Corpo do Projeto e TCLE

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. As inadequações foram corrigidas

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1881711.pdf	21/04/2022 15:56:28		Aceito
Outros	Lista_adequacoes.pdf	21/04/2022 15:55:04	THIAGO DE CARVALHO REIS	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br