

LETÍCIA ROCHA BORGES

**DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO
AGUDA DO TRATO GASTROINTESTINAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS.
ESTUDO DESCRITIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DOS EXAMES
COMPLEMENTARES.**

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2011

LETÍCIA ROCHA BORGES

**DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO
AGUDA DO TRATO GASTROINTESTINAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS.
ESTUDO DESCRITIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DOS EXAMES
COMPLEMENTARES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo

Linha de Pesquisa: Estudo da Permeabilidade Intestinal

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Sales da Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Osvaldo da Gama Torres

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2011

Borges, Leticia Rocha.
B732d Diagnóstico da doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda do trato gastrointestinal em pacientes submetidos a transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas [manuscrito]: estudo descritivo ... / Leticia Rocha Borges. - - Belo Horizonte: 2011.
112f.: il.
Orientador: Aloísio Sales da Cunha.
Co-Orientador: Henrique Osvaldo da Gama Torres.
Área de concentração: Ciências Aplicadas Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Transplante Homólogo. 2. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. 3. Doença Enxerto-Hospedeiro. 4. Mucosite. 5. Endoscopia do Sistema Digestório. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Cunha, Aloísio Sales da. II. Torres, Henrique Osvaldo da Gama. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WH 380

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Centro de Pós-Graduação:

Coordenador: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica:

Prof^a. Anelise Impeliziere Nogueira

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto:

Coordenadora: Prof^a. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Subcoordenadora: Profa. Valéria Maria de Azeredo Passos

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto:

Representantes docentes:

Profa. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Profa. Suely Meireles Rezende

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Representantes discentes:

Trabalho realizado com o suporte financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas
Gerais (FAPEMIG), Demanda Universal.

Referência FAPEMIG: CDS-APQ-00371-08

Referência FUNDEP: número 14168

Às minhas filhas Beatriz e Raquel, razões do meu viver e de se ter um objetivo.

Ao meu marido Sérgio Eduardo, pela paciência, carinho e companheirismo infinitos.

Aos meus pais Alder e Marly, exemplos de vida e dedicação.

Com todo o meu amor...

.... eu dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, onipresente.

Ao **Professor Aloísio Sales da Cunha**, orientador e exemplo acadêmico, pelo apoio, paciência, dedicação e inestimável contribuição para a finalização desse estudo.

Ao **Professor Henrique Osvaldo da Gama Torres**, mestre e amigo desde a época de faculdade. Obrigada pelo apoio. Esteja certo de minha gratidão e respeito.

Ao **Professor Anilton César Vasconcelos** do Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que gentilmente me acolheu, pela disponibilidade na realização dos estudos de imunohistoquímica e índice apoptótico e pela preciosa ajuda no entendimento dos mecanismos da apoptose.

Aos **Professores Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira (*in memoriam*) e Alfredo José Afonso Barbosa** do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, pela contribuição na concepção desse projeto e na revisão das lâminas de histologia.

Aos **colegas e amigos da Equipe de Transplantes de Medula Óssea** do Hospital das Clínicas da UFMG que, gentilmente, me ajudaram no recrutamento e no acompanhamento dos pacientes.

À **M^e Cláudia Maria de Castro Mendes** e demais membros do Serviço de Endoscopia Digestiva do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pelas orientações sobre o procedimento de endoscopia e realização dos exames.

Aos membros do **Grupo de Estudos da Barreira Gastrointestinal**, em especial ao **Professor Eduardo Garcia Vilela** e à bioquímica **Juliana Brovini Leite** pela realização e auxílio na interpretação dos exames de permeabilidade intestinal.

À acadêmica **Thaissa Garcia Barbosa de Figueiredo** pelo auxílio no recrutamento de pacientes e na realização dos exames de permeabilidade intestinal.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto** por tantos ensinamentos que me tornaram uma profissional melhor para a conclusão desse trabalho.

À minha irmã **Luciana**, companheira de todos os momentos, e aos meus irmãos **Lauro e Leandro** que, mesmo longe, nunca deixaram de enviar palavras de incentivo.

A todos os meus **familiares, amigos e colegas de profissão** que estiveram ao meu lado durante todo o desenvolvimento dessa dissertação, meus sinceros e profundos agradecimentos, principalmente, por compreenderem meus momentos de ausência.

Muito obrigada!

“Pois o belo muda, o saber muda, a inteligência muda, a medida muda, mas o desejo é inalterável.”

Rubem Fonseca

RESUMO

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda é uma das maiores complicações dos transplantes alogênicos de células-tronco hematopoéticas (TACTH) e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos a essa modalidade de tratamento. O diagnóstico da DECH aguda do TGI é difícil de ser estabelecido utilizando-se apenas parâmetros clínicos o que leva a necessidade da confirmação diagnóstica por métodos complementares, no caso da DECH aguda do TGI, realização de endoscopia com biópsias. Este estudo teve por objetivo realizar a análise descritiva das alterações da avaliação do índice apoptótico e dos estudos de permeabilidade intestinal em associação aos dados clínicos, endoscópicos e histopatológicos de pacientes submetidos à TACTH, com ênfase no diagnóstico da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda intestinal. Foram incluídos 31 pacientes submetidos à TACTH, na Unidade de Transplantes do HC-UFMG e que foram divididos em dois grupos – um grupo com diagnóstico clínico de DECH e um grupo sem diagnóstico clínico de DECH. Ocorreram 13 óbitos (41,9%) no período do estudo, nos 31 casos estudados, o que reafirma a gravidade das alterações encontradas nos pacientes. Quinze pacientes submetidos a 21 procedimentos de esofagogastroduodenoscopia até o D+90 pós-transplante apresentaram alterações endoscópicas visíveis e 19 biópsias revelaram alterações histológicas no estômago e duodeno. Observamos índices apoptóticos mais elevados nos pacientes que faleceram, nos pacientes que faleceram por DECH, nas formas mais graves de DECH e à presença de DECH clínica. Os resultados da avaliação da permeabilidade intestinal, realizada nos três períodos propostos em apenas nove pacientes, mostram alterações, algumas pronunciadas, inclusive na fase pré-transplante e, portanto, pré-condicionamento.

Nesse sentido, o projeto de pesquisa integra o esforço para aperfeiçoar os métodos para o diagnóstico da DECH aguda gastrointestinal, objetivando seu diagnóstico mais preciso e precoce.

Palavras-chave: Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; doença do enxerto-contra-hospedeiro; endoscopia do sistema digestório; biópsia; histologia; apoptose, imunohistoquímica; permeabilidade intestinal, mucosite.

ABSTRACT

Acute graft-versus-host disease (GVHD) is one of the major causes of morbidity and mortality in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (AHSCT), and has thus become the subject-matter of several studies on understanding and treating it. This study does a descriptive analysis of apoptotic index evaluation and intestinal permeability alterations in association with the clinical, endoscopic and histopathological data on 31 patients undergoing AHSCT at the Transplant Unit of HC-UFMG, with emphasis on acute intestinal graft-versus-host disease (GVHD) diagnosis. Patients were divided into two groups – one of patients with a clinical GVHD diagnosis and one of those with no clinical GVHD diagnosis. Thirteen deaths (41.9%) occurred during the study period among the 31 cases studied, thereby reaffirming the severity of the alterations found in the patients. Fifteen patients subjected to 21 esophagogastroduodenoscopy procedures prior to D+90 post-transplant had visible endoscopic alterations and 19 biopsies revealed histological alterations to their stomach and duodenum. We find higher apoptotic indices, not reaching statistical significance, in patients who died of graft versus host disease (GVHD), in the more acute forms of GVHD and where clinical GVHD was present. The results of intestinal permeability evaluation carried out on only nine patients in the three proposed periods showed alterations, some of which were pronounced even during pre-transplant, and, therefore, the pre-conditioning phase.

Accordingly, this ?? is part of the effort to improve the methods for diagnosing acute gastrointestinal GVHD, with a view to a more accurate and early diagnosis.

Keywords: Hematopoietic stem-cell allogeneic transplantation; graft versus host disease; endoscopy of the digestive system; biopsy; histology; apoptosis, immunohistochemistry; intestinal permeability, mucositis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

⁵¹ Cr-EDTA	Etilenodiaminotetraacetato marcado com cromo radiotativo
^{99m} TcDTPA	^{99m} tecnécio-dietilenetriaminopente-acetato
AGA	Anticorpo anti gliadina IgA
AINE'S	Anti-inflamatórios não esteróides
CAA	Células apresentadoras de antígeno
CLT	Linfócitos T citotóxicos
CMV	Citomegalovírus
CSA	Ciclosporina A
CTP	Célula-tronco periférica
Da	Dáton
DAB	Diaminobenzidina
DC	Doença de Crohn
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FK560	Tacrolimus
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GVL	<i>Graft-versus-leukemia effect</i>
HC-UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Complexo Maior de Histocompatibilidade Humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IA	Índice apoptótico
IBMTR	<i>International Blood and Marrow Transplant Research</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
INF γ	Interferon gamma
IV	Intravenoso
LMC	Leucemia mieloide crônica
LBM	Lesão de barreira mucosa
LPS	Lipopolissacaride
M ϕ	Macrófago
mHA	Antígenos menores de histocompatibilidade
MMF	Micofenolato mofetil
MO	Medula óssea
MRT	Mortalidade relacionada ao transplante
MTX	Metotrexato
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NP	Nutrição parenteral
PAMP's	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PEG	Polietilenoglicol
PRR's	<i>Pathogen-recognition receptors</i>
SARA	Síndrome de angústia respiratória do adulto
SOS	Síndrome de obstrução sinusoidal
TACTH	Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas
TBI	Irradiação corporal total
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
Th1 e Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 1 e 2
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF γ	Fator de necrose tumoral gamma
TUNEL	<i>TdT-mediated DNTP Nick end Labeling</i>
VO	Via oral

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u> – Estadiamento da DECH aguda para cada órgão isolado (Anexo 2).....	95
<u>Tabela 2</u> – Estadiamento clínico geral da DECH aguda (Anexo 2).....	95
<u>Tabela 3</u> – Marcadores de permeabilidade intestinal, seus pesos moleculares e taxas de permeação intestinal em indivíduos saudáveis, em amostras de urina de cinco horas (Anexo3).....	96
<u>Tabela 4</u> – Classificação de Sidney.....	51
<u>Tabela 5</u> – Características demográficas, de diagnóstico e de tratamento dos pacientes analisados.....	56
<u>Tabela 6</u> – Estadiamento clínico geral dos pacientes com diagnóstico de DECH aguda.....	56
<u>Tabela 7</u> – Estadiamento clínico de cada órgão isolado dos pacientes com diagnóstico de DECH aguda.....	57
<u>Tabela 8</u> – Correspondência entre o diagnóstico clínico de DECH aguda e as alterações endoscópicas e histológicas pós-TACTH.....	58
<u>Tabela 9</u> – Correspondência entre as alterações endoscópicas e histológicas.....	58
<u>Tabela 10</u> – Resultados dos IA dos pacientes do estudo (Anexo 5).....	103
<u>Tabela 11</u> – Resultados da análise estatística do IA dos pacientes do estudo (Anexo 5).....	104
<u>Tabela 12</u> – Comparação entre os valores do IA e óbitos.....	63
<u>Tabela 13</u> – Comparação entre os valores do IA e os óbitos por DECH, óbitos por MRT (não-DECH) e pacientes vivos.....	64
<u>Tabela 14</u> – Comparação entre os valores do IA e a gravidade da DECH clínica aguda intestinal.....	65
<u>Tabela 15</u> – Comparação entre os valores do IA e o resultado da EDA.....	65
<u>Tabela 16</u> – Comparação entre os valores do IA e o resultado da histologia.....	66
<u>Tabela 17</u> – Correspondência entre o diagnóstico clínico de DECH aguda e a permeabilidade intestinal no período pré-TACTH e nos D+14 e D+30 pós-TACTH.....	67

<u>Tabela 18</u> – Resultados da R L/M pré-TACTH e dos D+14 e D+30 pós-TACTH dos 31 pacientes estudados	68
<u>Tabela 19</u> - Relação entre a presença de mucosite grave e DECH clínica.....	69

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> - Fisiopatologia da DECH.....	23
<u>Figura 2</u> – Fase 1 da fisiopatologia da DECH.....	24
<u>Figura 3</u> – Vias de permeação. Desenho esquemático que ilustra a teoria de duas vias de permeação e a via única de permeação utilizando as junções firmes.....	34
<u>Figura 4</u> – Teoria de Hollander para a permeação de macro e micromoléculas.....	35
<u>Figura 5</u> – Cromatograma representando a curva correspondente à taxa de excreção urinária da lactulose.....	49
<u>Figuras 6 a 8</u> – Tela do computador com programas de análise de imagens (Image Pro Plus versão 4.5), utilizado para cálculo dos índices apoptóticos.....	59 e 60
<u>Figuras 9 a 11</u> – Células inflamatórias em apoptose demonstrando fragmentação do DNA/TUNEL (objetiva 40 X).....	61 e 62
<u>Figuras 12 e 13</u> – Mucosa do trato gastrointestinal. Células inflamatórias em apoptose expressando a proteína Bax (Imunohistoquímica para Bax).....	62 e 63
<u>Figura 14</u> – Gráfico de comparação entre a média do IA dos óbitos e não-óbitos.....	64
<u>Figura 15</u> – Gráfico com os resultados da comparação entre os IA dos óbitos por DECH, óbitos por MRT e pacientes vivos.....	64
<u>Figura 16</u> – Gráfico dos resultados do IA nos diferentes graus de estadiamento clínico da DECH agudo do TGI dos pacientes do estudo.....	65
<u>Figura 17</u> – Gráfico comparando os resultados dos IA com os de EDA.....	66
<u>Figura 18</u> – Gráfico comparando os resultados dos IA com os da histologia.....	66

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	19
1.1 – Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.....	19
1.2 – Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda.....	21
1.2.1 – Conceito, incidência e fatores preditivos.....	21
1.2.2 – Fisiopatologia.....	22
1.2.3 – O papel do trato gastrointestinal (TGI) e da lipopolissacáride.....	24
1.2.4 – Manifestações clínicas.....	25
1.2.5 – Profilaxia e tratamento.....	26
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 – Diagnóstico da DECH aguda do trato gastrointestinal.....	28
2.1.1 – Diagnóstico clínico e radiológico.....	28
2.1.2 – Diagnóstico endoscópico.....	29
2.1.3 – Diagnóstico histológico e imunohistoquímico.....	30
2.2 – Permeabilidade intestinal.....	31
2.2.1 – O papel do TGI como uma barreira.....	31
2.2.2 - Conceito e rotas de permeação.....	32
2.2.3 – Avaliação da permeabilidade intestinal.....	36
2.2.4 – Aplicações clínicas.....	37
2.2.5 – Permeabilidade intestinal e DECH.....	40
3 – OBJETIVOS.....	44
4 – PACIENTES E MÉTODOS.....	45
4.1 – Pacientes.....	45
4.2 – Avaliação clínica da DECH.....	47
4.3 – Testes de permeabilidade intestinal.....	48
4.4 – Exames de endoscopia digestiva alta e histologia – padrão de referência.....	50
4.5 – Obtenção do índice apoptótico (IA) e imunohistoquímica.....	52
4.5.1 – Obtenção do IA.....	52
4.5.2 – Detecção <i>in situ</i> de apoptose: método de TUNEL.....	52
4.5.3 – Avaliação de apoptose pela expressão da proteína Bax.....	53

4.5.4 – Análise morfológica.....	53
4.6 – Análise estatística.....	54
4.7 – Aspectos éticos.....	54
5 – RESULTADOS.....	55
5.1 – Pacientes.....	55
5.2 – Alterações endoscópicas.....	57
5.3 – Alterações histológicas.....	58
5.4 – Índice apoptótico.....	59
5.5 – Permeabilidade intestinal.....	67
5.6 – Mucosite.....	68
6 – DISCUSSÃO.....	70
6.1 – O diagnóstico clínico versus o “padrão-ouro” e a busca por outros métodos preditivos ou diagnósticos da DECH aguda.....	70
6.2 – O diagnóstico endoscópico e a histologia como “padrão-ouro”.....	72
6.3 – Avaliação do Índice Apoptótico.....	74
6.4 – Os testes de avaliação de permeabilidade intestinal para diagnóstico da DECH aguda do TGI.....	77
6.5 – Considerações finais.....	79
7- CONCLUSÕES.....	81
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TACTH)

O transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TACTH) é uma opção terapêutica curativa para tratamento de inúmeras patologias hematológicas malignas e não malignas, sendo hoje uma modalidade terapêutica bem consolidada.

Os transplantes alogênicos se tornaram possíveis a partir de meados dos anos 60, após estudos com irradiação corporal total em animais e identificação e tipificação do HLA – complexo maior de histocompatibilidade humano. Os primeiros transplantes foram realizados em pacientes portadores de leucemia refratária ao tratamento convencional e submetidos a uma preparação com irradiação corporal total e ciclofosfamida endovenosa.^{1,2}

Hoje, sabemos que a quimioterapia utilizada para tratamento de doenças malignas age primariamente nas células em proliferação e que células-tronco normais ou malignas são quiescentes, portanto, podendo ser insensíveis à quimioterapia convencional ou até mesmo à quimioterapia ou radioterapia em doses letais como a utilizada para preparação para o transplante. Entretanto, essas células podem ser eliminadas por células do doador (enxerto alogênico) imunologicamente ativas, por meio de reações relacionadas à histocompatibilidade, onde a gravidade da reação dependerá do grau de incompatibilidade. O efeito enxerto contra leucemia/tumor (*graft-versus-leukemia effect* – *GVL*) está relacionado ao potencial curativo dos TACTH e se baseia no efeito imunológico antitumor que é conferido pelas células-T do doador e outros efetores imunes. As células-T do doador reagem com antígenos menores de histocompatibilidade de células leucêmicas, inibindo o crescimento de suas colônias ou até mesmo as eliminando, assim como identificam a expressão de proteínas aberrantes dessas células, inibindo a formação de colônias leucêmicas sem alterar as normais. No entanto, o efeito *GVL* mediado pelo enxerto alogênico tipicamente coexiste com a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), que é a maior complicação do TACTH e que será descrita a seguir.^{1,3,4}

O TACTH é um processo contínuo que, de uma forma prática, é dividido em etapas, destacando-se os pontos mais importantes:

Regimes de condicionamento: A primeira etapa ou fase de condicionamento compreende o período antes da infusão de células-tronco em que o receptor é submetido à quimioterapia e/ou radioterapia, de um modo geral em altas doses, promovendo mieloablação e imunossupressão, chamado de condicionamento mieloablativo ou com o uso de medicamentos com alta capacidade imunossupressora denominado de condicionamento não-mieloablativo ou de intensidade reduzida. Os regimes de condicionamento têm como objetivo erradicar o câncer e promover imunossupressão que permita a pega do enxerto. Os transplantes realizados com

regimes de intensidade reduzida são menos tóxicos e utilizados quando se pretende a eliminação imunológica das células-tronco tumorais. Também antes da infusão de células-tronco, o paciente inicia terapia profilática imunossupressora, como será descrito a seguir.^{1,5,6}

Dia zero: Consideramos como dia zero o dia em que o receptor recebe as células-tronco hematopoéticas. As principais fontes de células-tronco utilizadas para transplante alogênico hoje são: 1) medula óssea (MO), retirada por aspiração em crista ilíaca posterior sob anestesia geral ou local; 2) células-tronco periféricas (CTP), que são mobilizadas da medula óssea para a corrente sanguínea com o uso de fatores de crescimento (G-CSF) e coletadas por técnicas de aférese. As CTP são capazes de promover reconstituição hematopoética mais rápida, mas contêm uma quantidade maior de células-T; 3) sangue de cordão umbilical e da placenta, que é rico em células-tronco hematopoéticas, mas limitado em volume. Com relação à compatibilidade HLA, o doador pode ser aparentado (irmão), não-aparentado (“bancos de medula”) ou haploidentico (uso de irmão ou parente com apenas um haplótipo HLA idêntico).^{1,2,7,8,9}

Fase pós-transplante: Após a infusão de células-tronco, seguem as etapas pós-transplante. As principais complicações relacionadas ao TACTH se encontram nessa fase e são divididas em complicações precoces, isto é, antes dos 100 dias pós-TACTH, e tardias, após 100 dias de TATCH.

Complicações precoces: 1) A mucosite, em curto prazo, é a principal complicação dos regimes mieloablativos e do uso de metotrexate como profilaxia imunossupressora. Está associada a quadro doloroso, ulcerativo e descamativo de mucosa orofaríngea e do TGI, e à náusea, dor abdominal em cólica e diarreia. Muitas vezes requer suporte nutricional enteral ou parenteral, analgesia com opióides e está associada a complicações infecciosas e hemorrágicas;¹⁰ 2) Uma segunda complicação é a doença síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), síndrome potencialmente fatal associada a hepatomegalia dolorosa, icterícia e retenção hídrica (ganho de peso) podendo levar à falência renal e respiratória. Está associada a dano do endotélio dos sinusoides hepáticos pelos regimes de condicionamento;¹¹ 3) Lesão pulmonar também pode ocorrer devido à resposta imunológica dos linfócitos-T do doador contra o pulmão, com altas taxas de mortalidade;¹² 4) Infecções são muito frequentes e estão associadas ao dano mucoso em orofaringe e TGI e alterações da pele relacionados ao regime de condicionamento, além da presença de cateteres centrais, neutropenia grave e imunodeficiência;¹³ 5) E, finalmente, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda, a mais importante complicação dos TACTH e que será descrita em detalhes.¹⁴

Complicações tardias: 1) A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica é patologia multifatorial, onde os linfócitos-T do doador exercem papel principal. Tem incidência de 20% a 80% e se manifesta com alterações multissistêmicas semelhantes às doenças auto-imunes, por longos períodos de tempo, mesmo com o tratamento. Está relacionada à imunossupressão grave e complicações devido ao uso crônico de corticóides; 2) Infertilidade devido à

quimioterapia mieloablativa; 3) Problemas de crescimento e desenvolvimento na infância; 4) Doenças malignas secundárias, incluindo mielodisplasia e leucemias agudas.^{15,16}

1.2 – Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECH)

1.2.1 – Conceito, incidência e fatores preditivos

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma patologia característica dos TACTH e sua maior complicação, permanecendo como o maior obstáculo para um desfecho mais favorável dessa modalidade de tratamento. A DECH aguda é caracterizada por lesão tecidual de órgãos alvo causada pela aloreatividade dos linfócitos-T do doador, infundidos no receptor junto com o enxerto de células-tronco, que reconhecem antígenos teciduais do receptor e que também são críticas para o efeito anti-tumor e para a imunidade antimicrobiana após TACTH.¹⁷ Sua primeira descrição foi feita em animais, em 1955, e o termo “enxerto-contra-hospedeiro” introduzido para descrever o “vetor” desse ataque imunológico, ao final dos anos 50.¹⁴

Tradicionalmente, tem sido definida como DECH aguda aquela que ocorre dentro dos primeiros 100 dias de transplante, sendo sua manifestação predominante na pele, fígado e TGI. DECH aguda clinicamente significativa é vista em 20% a 50% dos pacientes transplantados com doadores HLA idêntico aparentado e, em doadores HLA idênticos não aparentados ou com presença de incompatibilidade HLA, sua incidência aumenta significativamente para 60% até 80%, a despeito do uso de profilaxia com imunossuppressores. É a maior causa de morbidade após TACTH e responsável por 15% a 40% da mortalidade relacionada ao transplante (MRT).¹⁸

A DECH aguda é patologia de manuseio difícil não só por estar associada à alta morbidade e mortalidade, mas também à lesão de órgãos, infecções frequentes e geralmente graves, e desnutrição, provocados tanto pela lesão própria da DECH quanto pela imunossupressão utilizada para seu tratamento.

Vários são os fatores determinantes da gravidade e cinética da DECH sendo os mais importantes a disparidade de HLA, diferenças de sexo entre doador/receptor e paridade da doadora, idade (sendo maior a incidência em pacientes mais velhos) e fonte de células-tronco utilizada (aumento das taxas de DECH aguda e crônica em pacientes que utilizam CTP). Outros fatores são a dose de células-tronco hematopoéticas infundidas, a imunomodulação, os níveis de citocinas inflamatórias e a presença de polimorfismo genético.^{17,18,19,20,21}

1.2.2 – Fisiopatologia

Billingham²² definiu que para o possível desenvolvimento da DECH em pacientes submetidos à TACTH três requisitos são fundamentais: o enxerto deve conter células imunologicamente competentes, isto é, células-T maduras; o receptor deve ser incapaz de rejeitar o transplante, portanto ser imunossuprimido; e o receptor deve expressar antígenos tissulares que não estão presentes no doador.¹⁸

Obedecidos aos três requisitos, o desenvolvimento e a evolução da DECH aguda são considerados como um processo de três etapas sequenciais nas quais os sistemas imunes inato e adaptativo interagem.

As três etapas são (Figura 1):

(1) lesão tissular do receptor pelo condicionamento pré-transplante com radioterapia/quimioterapia;

(2) ativação das células-T do doador pelas células apresentadoras de antígenos (CAA) do receptor e consequente expansão clonal – “tempestade citoquímica”;

(3) efetores celulares tissulares e inflamatórios.^{18,23,24,25,26}

É a fase inicial ou fase 1 da fisiopatologia da DECH que determina a relevância do TGI nesse mecanismo. O modelo de interação microbiana descrito na Figura 2 é, hoje, o mais aceito.¹⁷

A relação entre intensidade do regime de condicionamento, quimiocinas e citocinas inflamatórias e a gravidade da DECH foi confirmada por estudos em animais e observação clínica.^{27,28,29}

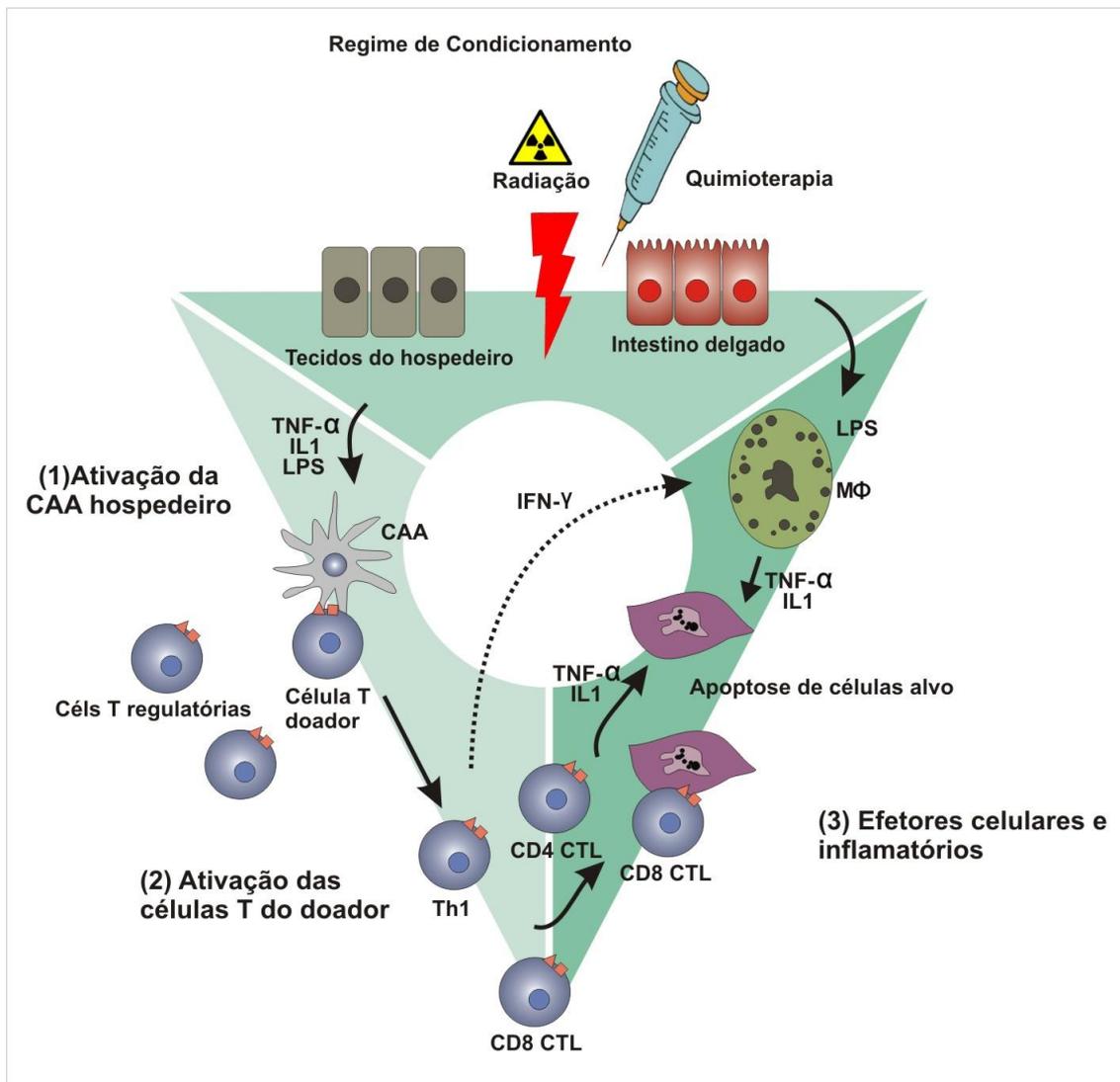


Figura 1: A fisiopatologia da DECH.

A fisiopatologia da DECH pode ser dividida em três fases. Na fase (1), o regime de condicionamento (quimioterapia, irradiação ou ambos) leva à lesão e ativação dos tecidos do hospedeiro, especialmente a mucosa intestinal do TGI. Isso permite a translocação de lipopolissacárides (LPS) do lúmen intestinal para a circulação, estimulando a secreção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) dos tecidos do hospedeiro, principalmente dos macrófagos (M ϕ). Essas citocinas aumentam a expressão dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (HLA) e a adesão de moléculas, aumentando o reconhecimento do HLA e dos antígenos menores de histocompatibilidade (mHA) por células T maduras do doador.

A ativação das células-T na fase (2) é caracterizada pela predominância das células Th1 e pela secreção de interferon-gama (IFN- γ), que ativam os fagócitos mononucleares.

Na fase (3), as funções efetoras dos fagócitos mononucleares ativados são desencadeadas por sinais secundários oriundos da LPS e de moléculas inflamatórias que são liberadas pela mucosa intestinal lesada durante as fases (1) e (2). Macrófagos ativados, junto com os linfócitos T citotóxicos (CTL), secretam citocinas inflamatórias e causam apoptose de células-alvo. Células CD8+ também lisam células-alvo diretamente. A lesão do TGI nessa fase, principalmente por citocinas inflamatórias, amplifica a liberação de LPS e leva à "tempestade citotóxica" característica da gravidade da DECH aguda. Este dano resulta na amplificação da lesão tissular local que, posteriormente, promove resposta inflamatória.²³

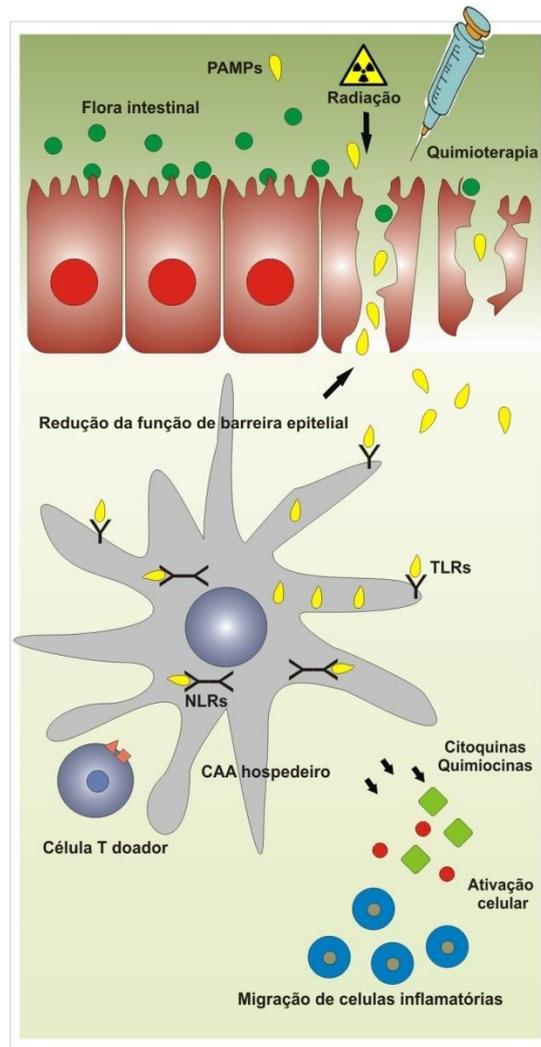


Figura 2: Fase 1 da fisiopatologia da DECH.

O início do processo inflamatório ocorre devido ao evento chave onde os receptores inatos (*pathogen-recognition receptors [PRR's]*) nas células apresentadoras de antígenos, como os *Toll-like receptors (TLRs)* e os *NOD-like receptors (NLRs)*, são ativados pelos microorganismos ou produtos microbianos (*pathogen-associated molecular patterns [PAMP's]*), levando à liberação de citocinas e migração de células inflamatórias.¹⁷

1.2.3 – O papel do trato gastrointestinal (TGI) e da lipopolissacáride (LPS)

A LPS é o maior componente estrutural das bactérias Gram negativas que compõe a flora intestinal normal e é uma potente estimuladora da ativação celular e liberação de citocinas como descrito acima.

A mucosa intestinal, inicialmente lesada pelo regime de condicionamento durante a primeira fase, libera para a corrente sanguínea a LPS que ativam macrófagos a produzir citocinas solúveis e que também são ativados pelo regime de condicionamento, principalmente por irradiação corporal total (TBI) e pela secreção de citocinas Th1, especificamente o IFN- γ , que faz com que monócitos e macrófagos sejam extremamente

sensíveis a LPS endógena. Sendo o TGI um alvo particularmente sensível aos efeitos tóxicos dessas citocinas, lesão do TGI durante a fase efetora leva a mecanismo de retroalimentação positivo em que o aumento da translocação de LPS aumenta a produção de citocinas que levarão a aumento da lesão do TGI.^{18,19,23,24,28,30}

Outros produtos bacterianos, como cópias de DNA CpG presentes no lúmen do TGI têm potente propriedade imunoestimulatória e induz a forte resposta Th1, e superantígenos bacterianos podem ativar células-B por estimulação direta de moléculas de classe II do HLA.²³

Portando, o TGI é o principal responsável pela “tempestade de citocinas” característica da DECH aguda e pela amplificação da doença sistêmica. Níveis séricos elevados de LPS têm sido correlacionados diretamente com o grau de lesão intestinal na histopatologia. A redução da toxicidade intestinal está associada à maior sobrevida e à redução da doença sistêmica.^{28,31,32}

Esforços para erradicar ou simplesmente reduzir a carga de microorganismos gram-negativos do TGI já é prática em alguns centros transplantadores, sendo que a descontaminação do TGI pode reduzir DECH clínica. No entanto, seu efeito é apenas parcial, pois descontaminação intestinal bacteriana completa e sustentada só é conseguida em uma pequena proporção de pacientes e parece ser mais importante apenas em transplantes não-aparentados.³³

Redução nas doses de quimioterapia/radioterapia do condicionamento dos receptores (transplantes de condicionamento reduzido) também pode reduzir a incidência da DECH, mas estudos mostram uma correlação inversa entre a redução de dose do condicionamento e uma maior complacência com relação à profilaxia com imunossuppressores, o que acaba contribuindo para o aumento da DECH.^{30,32}

1.2.4 – Manifestações clínicas

Pele:

Exantema maculopapular é a manifestação inicial mais frequente da DECH aguda. As lesões podem ser pruriginosas ou dolorosas e vermelhas a violáceas na cor, podendo envolver inicialmente as palmas das mãos e plantas dos pés. À medida que o *rash* progride há confluência para orelhas, pescoço e tronco, geralmente associado à formação de pápulas. Necrose da epiderme é a forma de manifestação da DECH cutânea mais grave e a formação de bolhas e descamação lembra epidermólise tóxica. O diagnóstico diferencial deve incluir lesões cutâneas secundárias ao efeito da quimioterapia, alergia a drogas e exantema virótico. Biópsia de pele pode ajudar a estabelecer o diagnóstico.^{14,19}

Fígado:

O achado mais comum é o de icterícia colestática, sendo que falência hepática com encefalopatia causada unicamente pela DECH é rara. O diagnóstico diferencial inclui síndrome de obstrução sinusoidal (SOS), infecção e toxicidade por drogas. Hepatotoxicidade causada pela ciclosporina pode levar a hiperbilirrubinemia. A biópsia é útil, mas pode ser dispensada caso o paciente apresente manifestações típicas de DECH cutânea e/ou intestinal.^{14,19}

Intestino:

Sintomas de DECH aguda intestinal são de intestino delgado distal e cólon e serão descritos com detalhes posteriormente.

1.2.5 – Profilaxia e tratamento**Profilaxia:**

A profilaxia farmacológica da DECH aguda é feita com o uso de agentes imunossuppressores isolados ou em combinação. A principal estratégia é a inibição da enzima citoplasmática calcineurina, que é uma importante ativadora de linfócitos-T. Os inibidores da calcineurina ciclosporina A (CSA) e tacrolimus (FK506) têm mecanismo de ação, efetividade clínica e toxicidade semelhantes. Usualmente, eles são administrados em combinação com outros imunossuppressores, como o metotrexato, administrado em pequenas doses na fase precoce pós-transplante. Outras drogas que podem ser utilizadas incluem o micofenolato mofetil (MMF), sirolimus e corticóides.^{19,34}

Outra forma de prevenir o aparecimento da DECH é utilizar a depleção de células-T. No entanto, a diminuição da frequência e da gravidade da DECH nesta abordagem está associada a altas taxas de falha de pega do enxerto, recidiva da doença maligna de base, infecções e doenças linfoproliferativas.³⁵

Tratamento:**Terapia primária**

Virtualmente todos os pacientes recebem medicação imunossupressora profilática após transplante alogênico ou têm as células-T do doador depletadas. No entanto, apesar da eficácia dos regimes de profilaxia, a DECH continua sendo uma complicação frequentemente encontrada, principalmente em transplantes de doadores não-aparentados ou com HLA não-identico ou quando a profilaxia não pode ser administrada adequadamente devido à toxicidade. Portanto, a despeito do uso de profilaxia com ciclosporina e metotrexate, DECH aguda graus II a IV ocorre em 30% a 80% dos receptores de TACTH. O uso de corticosteróides,

habitualmente a metilprednisolona, na dose de 2 mg/Kg/dia, é a terapia primária padrão ouro para a DECH aguda devido a sua potente atividade antilinfocitária e antiinflamatória.^{14,36,37,38}

Terapia secundária

Terapia secundária está indicada no caso de falha da terapia primária. Uma definição prática de falência da terapia padrão primária com corticóides é progressão das manifestações da DECH durante três dias após início da metilprednisolona, persistência das manifestações da DECH graus III e IV durante sete dias, ou das manifestações da DECH grau II durante 14 dias de tratamento. Falha da terapia com corticóides é comum e aproximadamente 80% das respostas são incompletas ou completas, mas não sustentadas. Essa falha está associada a cerca de 75% da mortalidade relacionada ao TMO. Apenas 38% dos portadores de DECH aguda apresentam resposta completa à terapia primária e estão vivos em seis semanas após início da mesma.^{14,38,39,40}

Não existe terapia secundária padrão para tratamento da DECH aguda refratária a corticóides sendo que várias alternativas já foram estudadas e podem ser utilizadas com respostas variadas,^{38,40} incluindo o uso de medicamentos como imunoglobulina antitimocítica,⁴¹ sirolimus,⁴² tacrolimus⁴³ e micofenolato mofetil,⁴⁴ uso de células mesenquimais⁴⁵ e o uso de anticorpos monoclonais, principalmente, os específicos para receptores de interleucina 2,^{46,47} anti-TNF α ^{48,49} e anti-CD52.⁵⁰

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Diagnóstico da DECH aguda do TGI

2.1.1 – Diagnóstico clínico e radiológico

Na DECH aguda do TGI, as manifestações são variáveis, mas os sintomas mais comumente apresentados pelos pacientes são diarreia profusa, dor abdominal em cólica, náuseas, vômitos e anorexia. A diarreia é frequentemente líquida, secretória, usualmente volumosa (> 2 litros/dia), esverdeada, mucoide e com presença de células esfoliadas, que persiste mesmo com a ausência de ingestão oral. Em casos graves podem ocorrer sangramento intestinal – melena ou enterorragia, enteropatia por perda de proteínas ou íleo paralítico.^{19,51}

Náuseas e vômitos, anorexia e dispepsia persistentes, com evidência histopatológica de DECH, mesmo na ausência de diarreia devem ser incluídas como envolvimento do TGI, definido como DECH de TGI superior, sendo que esse responde bem à terapia imunossupressora, mas uma grande proporção dos pacientes evolui para DECH crônica.⁵²

Sangramento intestinal, que confere pior prognóstico, é secundário à ulceração da mucosa, e é frequente dentro dos primeiros 100 dias.^{19,53}

A diarreia característica da DECH ocorre devido a inúmeros mecanismos, incluindo: (1) dano aos enterócitos e deficiência da dissacaridase epitelial levando a um excesso de açúcares no lúmen e diarreia osmótica, com grande perda de água; (2) aumento na proporção de enterócitos imaturos com subsequente deficiência enzimática e defeito no transporte de água; (3) exsudação de proteínas e água por um epitélio hiperpermeável; (4) efeito das citocinas no transporte de líquidos; (5) necrose das células das criptas por mecanismos auto-imunes mediados pelas células-T; e (6) pela localização ileal dessas anormalidades.⁵⁴ No intestino grosso, a lesão dos enterócitos colônicos também leva à defeito na reabsorção da água.⁵³

Diarreia é comum após TACTH, ocorrendo em 45% a 79% dos pacientes. Usualmente, a etiologia da diarreia pode ser dividida em três grupos, baseado no tempo de transplante em que se encontra o paciente. Durante os primeiros 20 dias, a causa mais comum para diarreia é a toxicidade associada ao regime de condicionamento (mucosite), que pode ser responsável também por *rash* cutâneo, sendo esse o principal diagnóstico diferencial para a DECH aguda. A maioria dos episódios de diarreia acontece dentro desse período. Do dia +20 ao dia +100 pós-transplante, a maioria dos episódios é devido à DECH aguda. Infecção é relativamente rara durante esse período, correspondendo a menos de 10% dos casos. Após o dia +100, a maioria dos casos é decorrente de infecção entérica.^{53,54}

A graduação clínica da DECH aguda do TGI foi feita de acordo com a *Consensus Conference on Acute GVHD Grading*⁵⁵ (Anexo 2), segundo a qual o volume da diarreia, presença de dor abdominal, íleo paralítico ou náuseas persistentes influenciam em tal graduação. Sobrevida e grau da DECH aguda intestinal são inversamente proporcionais.⁵⁶

Segundo a *Consensus Conference*,⁵⁵ a classificação clínica da DECH aguda do TGI é a que se segue:

Grau I: acometimento isolado do TGI superior, com o paciente manifestando hiporexia acentuada/anorexia, náuseas e/ou vômitos, sem diarreia ou *rash* cutâneo – requer confirmação histológica com biópsia de estômago ou duodeno - ou presença de diarreia com volume de evacuação entre 500 a 1000 ml/dia.

Grau II: Diarreia, com volume de evacuação entre 1000 a 1500 ml/dia.

Grau III: Diarreia, com volume de evacuação > 1500 ml/dia.

Grau IV: Presença de diarreia e/ou dor abdominal grave e/ou íleo paralítico e/ou sangramento intestinal.

Estudos radiográficos não são específicos, mas podem mostrar estreitamento da parede do intestino, dilatação luminal e presença de ar ou nível de líquido, sugestivos de íleo paralítico.¹⁹

Os achados mais comuns em tomografias computadorizadas incluem combinação de patologias do intestino delgado e grosso, com distribuição frequentemente descontínua, estreitamento de parede moderado com grande reforço da mucosa e a escassez de achados extraintestinais, à exceção do envolvimento do trato biliar.⁵⁷

2.1.2 – Diagnóstico endoscópico

Os achados endoscópicos na DECH aguda não se correlacionam bem com os achados histopatológicos e variam de uma mucosa aparentemente normal até a presença de ulceração grave. A presença de lesões endoscópicas visíveis é encontrada em uma minoria dos pacientes (16% a 32%), mas, quando presentes, os achados endoscópicos mais comumente descritos são edema de mucosa, eritema leve a moderado e friabilidade. Erosões e úlceras são menos frequentemente encontradas.^{51,54,58} A porção do TGI em que há maior probabilidade de diagnóstico à biópsia também é objeto de debate. Apesar da maioria dos serviços utilizarem biópsias de estômago e duodeno por endoscopia digestiva alta, alguns evitam biópsia de duodeno por ser maior o risco de sangramento em pacientes plaquetopênicos e outros preconizam que biópsias por endoscopia digestiva baixa (retossigmoidoscopia) são melhores para o diagnóstico de DECH.⁵⁹

Socié *et al.*⁶⁰ estudando 95 pacientes com suspeita de DECH aguda ou crônica do TGI e submetidos à EDA pós-transplante, com média de idade de 35 anos (5-60 anos), encontrou aparência normal do estômago e duodeno em 75% das endoscopias, alterações leves, como eritema em 21% e maiores anormalidades, com aparência edematosa da mucosa e úlceras em apenas 4% dos procedimentos. Quando a análise foi restrita aos 65 pacientes com DECH aguda diagnosticada clinicamente, antes do D+100 pós-transplante, as alterações consistiram em aparência normal em 57% das endoscopias, alterações leves em 38% e maiores anormalidades em 8%.

2.1.3 – Diagnóstico histológico e imunohistoquímico

O principal achado histológico da DECH aguda do TGI é a apoptose de células epiteliais, originalmente descrita como degeneração de células da cripta e, posteriormente, determinada por exame ultraestrutural como aquele representando a morte por apoptose. Na DECH, a apoptose é mais proeminente no compartimento regenerativo da glândula ou da cripta. Quando desenvolvidas, essas células apoptóticas contêm vacúolos intracitoplasmáticos preenchidos com poeira nuclear e outros debris cariorréticos e têm sido descritas como “explosão de criptas”. O infiltrado inflamatório da lâmina própria é tipicamente esparsos e consiste primariamente de células mononucleares, apesar de esparsos eosinófilos e neutrófilos também serem encontrados. Embora nos casos leves os corpos apoptóticos constituam o único achado morfológico, nos casos mais graves, a dilatação cística das glândulas ou criptas devido ao epitélio regenerativo, abscessos de criptas, e franca destruição epitelial podem ser encontrados.^{51,60,61,62}

No estômago, as células apoptóticas tendem a ser menores e menos conspícuas que no cólon. Neutrófilos são encontrados menos frequentemente atualmente, provavelmente devido ao fato do diagnóstico ser feito em estágios mais precoces que nas descrições mais antigas. No duodeno e outros sítios do intestino delgado, menores graus de degeneração de criptas são vistos.⁵¹

O número de sítios examinados é importante, pois a DECH tende a ter uma distribuição descontínua e irregular, sendo recomendado examinar um número maior para evitar interpretações falso-negativas. A presença de um ou mais corpos apoptóticos no epitélio das criptas ou glandular por fragmento de biópsia, é considerada como “consistente com DECH”, na ausência de infecção concomitante ou suspeita de reação a drogas. Interpretações falso-positivas podem decorrer dos efeitos da quimioterapia de condicionamento, presença de infecções concomitantes e uso de certas drogas, como os inibidores de bomba de prótons.^{51,52}

As recomendações propostas para o diagnóstico histopatológico final nas biópsias, conforme recomendação do *NIH Consensus Project*⁵² são as seguintes:

- Ausência de DECH (para biópsias sem evidência de DECH);
- Possível DECH (para os casos com evidência de DECH, mas com outras possíveis explicações para os achados, como presença de CMV com corpos apoptóticos presentes perto das inclusões, colite associada ao MMF, ou achados que sugeriram reações a drogas);
- Consistente com DECH (evidência histológica clara de DECH, mas com fatores que possam mitigar o diagnóstico, como amostra limitada, mínimos achados com um único, ou raros corpos apoptóticos em células epiteliais, ou quimioterapia e radioterapia recentes. Uma biópsia com CMV, mas com abundantes corpos apoptóticos não associados às células infectadas e identificados por imunohistoquímica, deve ser consistente para DECH);
- Presença de DECH (evidência inequívoca de DECH).

Estudos imunohistoquímicos como uso de caspase 3 ativada para corpos apoptóticos não são recomendados na rotina clínica e não substituem uma coloração hematoxilina-eosina de boa qualidade, mas são importantes em pesquisas clínicas.^{51,63}

Socié *et al.*⁶⁰ mostram em seu trabalho que, quando presente, o edema era preferencialmente distribuído na parte superior da vilosidade duodenal, assim como os eosinófilos, muitos deles degranulados, o que é um sinal de ativação *in situ* dessas células. Eosinófilos ativados são associados a formas graves de DECH aguda intestinal.⁶²

Neutrófilos e células mononucleares marcadas por CD45 e CD68 não tinham distribuição específica, sendo vistas em toda extensão da lâmina própria. No entanto, células marcadas com o anticorpo específico anti-TNF estavam preferencialmente localizadas na parte superior da lâmina própria, quase sempre agrupadas em pequena quantidade e estavam presentes em 100% das biópsias dos pacientes com DECH aguda. Não foram vistas no epitélio, exceto em casos graves de DECH nos quais uma infiltração maciça dessas células foi observada.

Células expressando Fas não foram numerosas, mas estavam presentes somente nas biópsias com critérios histológicos de DECH (degeneração de criptas e apoptose de células epiteliais). Essas células inflamatórias foram encontradas tanto na lâmina própria e no epitélio glandular. Células apoptóticas foram vistas na lâmina própria, mas também no epitélio glandular em caso de DECH digestivo grave.

2.2 – Permeabilidade intestinal

2.2.1 – O papel do trato gastrointestinal como uma barreira

O sistema gastrointestinal apresenta várias linhas de defesa contra toxinas, antígenos e microorganismos, pois se constitui o maior sítio de exposição de nosso organismo ao meio

externo. Essas incluem mecanismos não específicos de proteção do lúmen, das células epiteliais e de resposta imunológica.

Mecanismos intestinais luminais começam com a presença do ácido gástrico e das enzimas digestivas. Adicionalmente, as células epiteliais das criptas secretam fluídos dentro do lúmen que, combinado com a mobilidade gastrointestinal, tendem a “lavar” bactérias e toxinas. Outro mecanismo de barreira não específico envolve a liberação de moléculas de auto-proteção, como a imunoglobulina IgA e peptídeos anti-microbianos conhecidos como defensinas e as células de Paneth intestinais, que atuam diretamente nas membranas de paredes bacterianas, bem como estimulam a secreção de ácido clorídrico.

Uma segunda linha de defesa é a resposta imunológica, realizada pelo sistema imune presente em uma área especializada do epitélio onde se encontram folículos linfóides. Uma vez estimulados, esses linfócitos maturam em células imunocompetentes, com a função principal de apresentação de antígenos. As citocinas IL-2 e IL-4 ativadas pelos antígenos que penetram no epitélio intestinal, atuam na expressão das subpopulações Th1 e Th2 dos linfócitos T CD4+ e auxiliam na maturação de linfócitos B, promovendo assim, a produção de anticorpos.

A última linha de defesa são as células epiteliais, que promovem a maior barreira física entre o lúmen intestinal e o hospedeiro. O citoesqueleto é a estrutura de sustentação do epitélio intestinal, que se estende através das porções látero-apicais das células e forma as junções firmes ou zônulas ocludentes, que representam uma interrupção natural à continuidade da membrana celular, tornando-se potenciais vias de acesso de macromoléculas. São barreiras dinâmicas que permitem, ou não, a passagem bidirecional de várias substâncias, incluindo possivelmente, células inflamatórias. Esse aspecto promove a base racional dos testes de permeabilidade intestinal que têm sido utilizados para estudo da função do trato gastrointestinal. Essas células promovem também papel importante na apresentação de antígenos a células imunes inatas.^{64,65,66}

A lesão da barreira mucosa é de difícil quantificação *in vivo*. Biópsias intestinais são impraticáveis em pacientes gravemente plaquetopênicos e com vômitos e náuseas intensos como ocorre frequentemente na quimioterapia do câncer. Além disso, mesmo que pudessem ser obtidas, o método não permite a detecção de todo um espectro de alterações funcionais que ocorrem independentemente de lesões histológicas, ou na vigência de alterações morfológicas muito sutis para detecção por métodos histológicos convencionais.⁶⁶

2.2.2 – Conceito e rotas de permeação

O conceito de permeabilidade está relacionado à propriedade da membrana intestinal de permitir a passagem de substâncias por difusão não-mediada, independentemente do gradiente de pressão ou de concentração e sem a assistência de sistema carreador bioquímico. A distinção entre absorção e permeação descreve os meios de transporte através

do intestino, mediado por carregador bioquímico e não-mediado pelo carregador, o que tem implicação para a nutrição e para a função de barreira intestinal, respectivamente. A difusão de substâncias através de uma simples membrana é determinada tanto por sua estrutura (composição, carga elétrica, espessura, etc.) quanto pelas propriedades da substância (tamanho molecular, forma, carga elétrica e solubilidade) e de sua interação com o meio (solvente). No contexto clínico, o conceito se aplica a substâncias com peso molecular maior que 150 Dáltons (Da).^{64,65,66}

A permeabilidade intestinal é avaliada não invasivamente, *in vivo*, pela medição da excreção urinária dos substratos do teste, administrados por via oral. É utilizado o princípio da diferença de excreção urinária de dois substratos, convencionalmente um dissacarídeo e um monossacarídeo juntos, que fornecem um índice específico da permeabilidade intestinal. No entanto, nenhum teste é abrangente o suficiente para examinar a função intestinal como barreira, sendo que a maioria dos métodos vai testar somente a barreira das células epiteliais.

A função de barreira exercida pelo epitélio intestinal pode ser considerada dinâmica, apresentando alterações transitórias reversíveis após estresse hiperosmolar e sendo afetada também por doenças, drogas, dieta, citoquinas, hormônios e fatores ambientais. A principal consequência dessas alterações é a maior permeação de antígenos à mucosa intestinal, que pode iniciar ou perpetuar processos inflamatórios. O crescente interesse pelo estudo da permeabilidade intestinal pode ser explicado pela possibilidade de se obter, de forma não invasiva, informações acerca de alterações que ocorrem no epitélio intestinal, capazes de elucidar a etiopatogenia de determinadas doenças e permitir a monitorização de medidas terapêuticas.^{64,65,66}

Estudos que mostraram diferenças consistentes dos resultados de permeabilidade de polímeros de polietilenoglicol – 400 (PEG400), dissacarídeos, monossacarídeos e etilenodiaminotetraacetato marcado com cromo radioativo (⁵¹Cr-EDTA), que compartilham propriedades físico-químicas semelhantes, e que não são explicadas pelas diferentes técnicas, procedimentos, doses no teste ou variações na coleta da urina, levaram à formulação de teorias que expliquem as rotas de permeação através da mucosa intestinal.⁶⁶ Continua controversa qual rota transepitelial é utilizada por esses substratos para acessar a corrente sanguínea. Os substratos parecem atravessar o epitélio por uma de três rotas: paracelular, transcelular aquosa e transcelular lipídica.⁶⁴

Na teoria das duas vias de permeação, na primeira rota, denominada de *transcelular*, as moléculas menores que 0,4 nm, como o manitol e a ranose, atravessam as membranas celulares através de pequenos poros aquosos (0,4 nm a 0,7 nm de raio), de alta incidência, presentes na membrana dos enterócitos. Na segunda, denominada de *paracelular*, a passagem de moléculas maiores que 0,5 nm, tais como a lactulose, a celobiose e ⁵¹Cr-EDTA,

ocorre através de canais aquosos maiores (6,5 nm de raio) existentes nas junções firmes, de baixa incidência e susceptíveis ao estresse hiperosmolar (Figura 3).⁶⁵

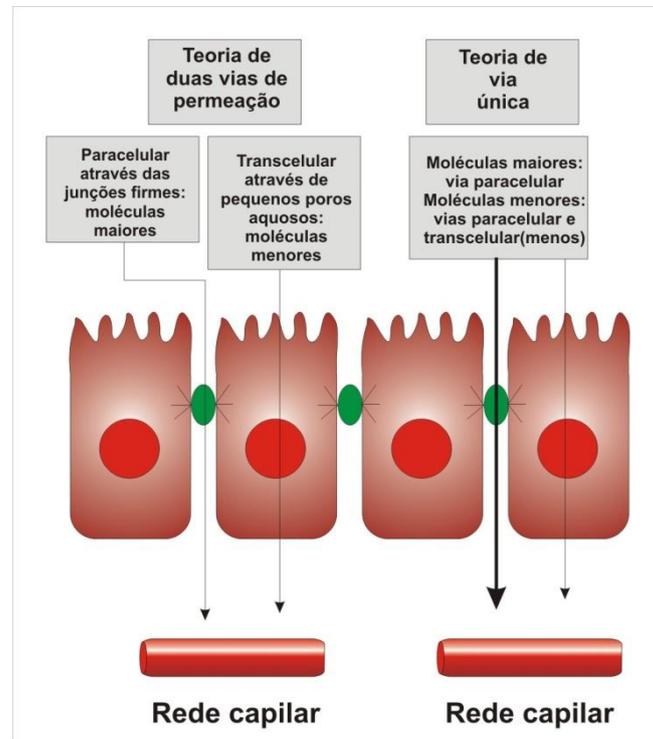


Figura 3: Vias de permeação. Desenho esquemático que ilustra a teoria de duas vias de permeação e a via única de permeação utilizando as junções firmes.

O segundo modelo, denominado teoria da via única, surgiu por ainda persistirem incertezas acerca de qual rota é utilizada por alguns marcadores. Quando se utilizam marcadores com pesos moleculares variados, em diferentes gradientes osmóticos, constata-se a presença tanto de poros eletroneutros maiores (6,5 nm) quanto de poros menores (0,7 nm), cátion-seletivos, localizados entre as células epiteliais. As moléculas maiores passariam exclusivamente pelos poros maiores através da via paracelular, enquanto as moléculas menores passariam pelos poros maiores e menores, utilizando as vias paracelular e transcelular, embora a contribuição da via paracelular para a permeação total das moléculas menores seja pequena.⁶⁵

Um modelo alternativo proposto por Hollander^{67,68} (Figura 4) para explicar a permeação de macro e micromoléculas é baseado na presença de resistência elétrica transepitelial e postula que todos os substratos atravessam pela via paracelular, nas junções firmes. A evidência de que a taxa de permeação do manitol relaciona-se de maneira inversa à resistência elétrica transepitelial explica sua alta porcentagem de permeação pela via

paracelular. Devido à heterogeneidade morfológica existente entre as junções intercelulares do intestino delgado, com poder de selamento progressivamente maior, à medida que os enterócitos migram das criptas para as vilosidades, pode-se afirmar que a permeação de macromoléculas como a lactulose e o $^{51}\text{Cr-EDTA}$ fica restrita às junções firmes das criptas, enquanto os monossacarídeos, devido ao seu diâmetro seccional menor, apresentam permeação livre através do eixo cripta-vilosidade.

Embora não haja consenso para explicar as vias de permeação, é fato que a permeação a macromoléculas aumenta em processos que causam reação inflamatória na mucosa intestinal, favorecida pelo afrouxamento nas junções intercelulares, enquanto a permeação dos monossacarídeos retrata a área absorptiva da mucosa, caracterizada pela estrutura vilositária do epitélio intestinal. Não está claro se o aumento da permeabilidade intestinal necessariamente implica em disfunção da barreira mucosa, mas ela pode ser o evento inicial de uma potencial ruptura em que a quebra da barreira parece estar associada a eventos adicionais. A progressão de mudanças na permeabilidade para o surgimento da doença aparentemente implica na presença de disfunção imune ou imunodeficiência relativa.⁶⁴

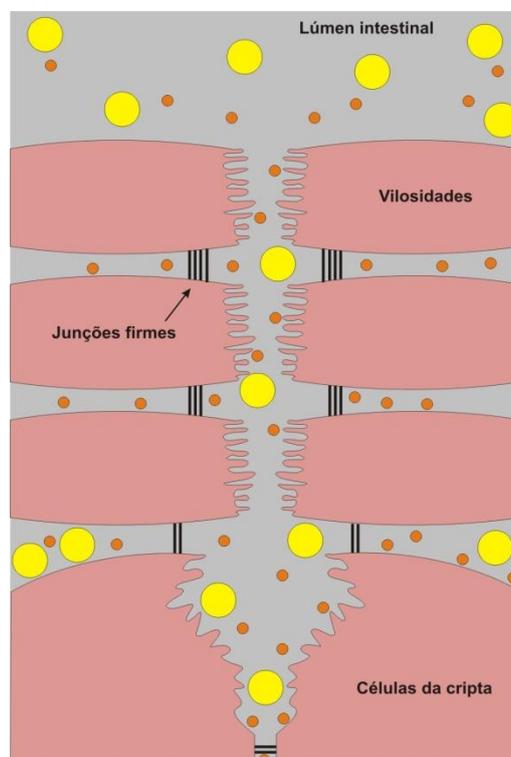


Figura 4: Teoria de Hollander para permeação de macro e micromoléculas.

2.2.3 – Avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal é estudada de forma não invasiva por métodos que avaliam a integridade da barreira epitelial pela excreção urinária de substratos administrados por via oral. Os substratos, absorvidos no intestino, são filtrados e recuperados na urina, usualmente durante um período de coleta de urina de cinco horas, sendo medidos nas amostras coletadas. Quando comparada às amostras sanguíneas, a medida na urina é mais apropriada, pois a concentração dos substratos no plasma é 100 vezes menor. Os substratos utilizados diferem em peso molecular e em tamanho, mas têm em comum o fato de serem, relativamente, pouco absorvidos no intestino normal, por serem pouco metabolizados e por não sofrerem reabsorção tubular. Portanto, uma absorção significativa de um substrato e sua dosagem aumentada nas amostras urinárias só ocorrerá quando houver lesão na barreira mucosa.⁶⁶

Inicialmente, substratos únicos, como lactulose, PEG, ⁵¹Cr-EDTA e dietilenetriaminopente-acetato marcado com tecnécio radioativo (^{99m}Tc-DTPA) foram utilizados, mas essa abordagem não foi a ideal porque fatores pré-mucosa, como esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, diluição por secreções e degradação bacteriana e fatores pós-mucosa, como doença renal, volume de distribuição, ou mesmo coleta incompleta da urina, assim como a própria permeabilidade intestinal, influenciavam a recuperação urinária desses substratos na urina. Para contornar essa deficiência, passou-se a utilizar a razão da excreção urinária de duas substâncias, usualmente um monossacarídeo e um dissacarídeo, como um índice específico da permeabilidade intestinal. Essa razão é mais precisa porque os fatores pré e pós-mucosa devem influenciar os substratos igualmente e, portanto, a razão da excreção urinária não é afetada.^{65,66}

Os testes utilizados para a avaliação da permeabilidade intestinal utilizam substratos que podem ser divididos em três grupos: 1) açúcares, 2) isótopos e 3) PEG. A escolha do teste adequado depende do conhecimento das propriedades de cada substrato. O marcador ideal deve ser biologicamente inerte e capaz de atravessar o epitélio intestinal por difusão não mediada, através de uma via conhecida.⁶⁹ A Tabela 3 no Anexo 3 mostra a relação dos substratos mais utilizados, seu peso molecular e porcentagem de excreção na urina, utilizando-se soluções isosmolares e hiperosmolares.

Os testes com açúcares têm sido os mais utilizados, principalmente os que empregam as combinações de dois substratos, um com uma molecular maior e outra menor, como lactulose/manitol e celbiose/manitol. A primeira combinação tem vantagem, pois algumas dissacaridases humanas têm efeito, ainda que pequeno, sobre a celbiose. Existe ainda dúvida a respeito da via utilizada pelo manitol, sendo presumível sua participação tanto na via paracelular como na transcelular. No entanto, independentemente da via, sua permeação diminui na presença de atrofia vilositária. A lactulose tem sua permeação aumentada na presença de qualquer processo inflamatório, pois causa afrouxamento nas junções firmes. As

soluções de açúcares utilizadas devem ser preferencialmente, isosmolares, pois permitem o estudo da barreira mucosa sem causar alterações da mesma, ao contrário do que ocorre quando se utilizam soluções mais concentradas, que determinam estresse hiperosmolar sobre a barreira e aumentam a permeação das macromoléculas. Para a triagem de doenças intestinais, no entanto, as soluções hiperosmolares podem ser úteis, porque aumentam a sensibilidade do teste. A excreção destes açúcares pode ser medida através da cromatografia líquida de alta *performance*, cromatografia líquido-gasosa ou por ensaios enzimáticos. As amostras de urina dos testes que utilizam açúcares podem ser armazenadas (congeladas) para análises posteriores.⁶⁵

Os testes que utilizam isótopos são mais facilmente mensurados, mas apresentam como desvantagem o fato de serem substratos radioativos. O mais utilizado é o ^{51}Cr -EDTA que, por ser resistente à degradação bacteriana, torna-se útil para avaliação da permeabilidade colônica. No entanto, seus valores de excreção renal apresentam ampla variação nos controles e apresenta meia-vida relativamente curta (27 dias), não permitindo maior viabilidade das amostras para armazenamento e posterior análise. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA é menos radioativo, mas apresenta meia-vida ainda menor (6 horas).⁶⁵

Moléculas de polietilenoglicol - PEG de diferentes tamanhos (PEG 400, PEG 600, PEG 1000 e PEG 4000) também podem ser utilizadas como substrato. O PEG 400 é o mais acessível, pois é comercialmente disponível e é composto por polímeros de peso molecular que podem ser separados por cromatografia líquida de alta *performance*. No entanto, a vantagem de se avaliar concomitantemente moléculas de tamanhos diferentes não foi constatada na prática, pois houve grande variação de seus níveis em indivíduos normais.⁶⁶

2.2.4. – Aplicações clínicas

Os testes de permeabilidade intestinal podem ser utilizados para diagnóstico de patologias gastrointestinais ou para avaliar a progressão clínica ou monitoramento de resposta ao tratamento dessas patologias.

Estes testes não invasivos podem preceder ou mesmo substituir a necessidade da realização de procedimentos invasivos para investigação do TGI, sendo, portanto mais vantajosos quando comparados ao padrão-ouro para a avaliação morfológica das lesões da mucosa gastrointestinal, que é a biópsia por endoscopia digestiva alta ou baixa ou por biópsia jejunal peroral. Entretanto, seu potencial como teste diagnóstico para doenças do trato digestivo ainda necessita ser determinado, pois apesar de ser reconhecida ferramenta diagnóstica para que sejam descartadas lesões da mucosa intestinal, sua capacidade de indicar a presença de anormalidades histológicas da mucosa tem sido amplamente discutida. Um exame normal não afasta a possibilidade de lesões da mucosa de grau leve a moderado, não eliminando a necessidade de outras avaliações diagnósticas.^{64,65,66}

Os que defendem sua aplicação acreditam que os testes de permeabilidade intestinal podem ser utilizados em situações especiais, como em pacientes com sintomatologia pouco característica do trato digestivo, em crianças e jovens com distúrbios do crescimento, nos quais a doença celíaca e a doença de Crohn (DC) permanecem como suspeita diagnóstica e, finalmente, como forma de confirmar a indicação da biópsia intestinal peroral ou outra avaliação funcional.⁷⁰

A quebra da integridade da barreira mucosa tem sido associada a mecanismos etiopatogênicos comuns a várias doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, bem como a doenças auto-imunes, como o diabetes mellitus e a dermatite atópica. Relaciona-se também à perpetuação da resposta inflamatória em doentes críticos, mesmo após a erradicação de infecções e focos de inflamação, conduzindo à síndrome da falência orgânica múltipla e, eventualmente, ao óbito. Outras doenças intestinais comuns, como giardíase ou infecção por rotavírus, estão consistentemente associadas a aumento da permeabilidade intestinal, sendo que, no entanto, os testes não têm especificidade diagnóstica.⁶⁴

A razão da excreção urinária de açúcares pode ser usada para confirmar o diagnóstico de doença celíaca, seguido de dieta isenta de glúten e de medidas de permeabilidade sequenciais, que podem determinar a necessidade de biópsia jejunal. Os testes de permeabilidade intestinal são comparáveis, em termos de sensibilidade, com o teste de absorção da D-xilose, gordura fecal ou folato sérico na detecção de pacientes com doença celíaca não tratada.⁶⁶ A permeabilidade intestinal encontra-se alterada em pacientes celíacos não tratados, com uma sensibilidade de até 96% usando-se a técnica de dois açúcares e atingindo 100% em alguns estudos em que foi utilizado o ⁵¹Cr-EDTA,⁷¹ sendo que também têm sido utilizados para avaliação da manutenção da fase de remissão. Aumento da permeabilidade ao ⁵¹Cr-EDTA que persiste após o tratamento pode representar ingestão inadvertida de glúten, sendo que Perry *et al.*⁷² demonstraram que, uma vez introduzida dieta isenta de glúten, o teste de permeabilidade intestinal apresenta valores semelhantes àqueles dos indivíduos saudáveis, em torno de seis meses depois do início do tratamento.

Vilela *et al.*⁷³ estudaram o comportamento do anticorpo antigliadina IgA (AGA) e o teste da permeabilidade intestinal para monitorar pacientes com doença celíaca em dieta de restrição de glúten. Em 22 pacientes celíacos e 11 pacientes normais e saudáveis, realizando a sorologia e o teste de permeabilidade intestinal antes do tratamento com a dieta e após 12 meses de observação sem glúten, puderam observar que o AGA permaneceu positivo em 40,9% dos pacientes celíacos e a média da excreção urinária de lactulose foi de 10,27% e manitol 10,18%, relação lactulose/manitol de 1,02. No subgrupo de 59,1% dos pacientes em que o AGA tornou-se negativo, o valor da lactulose foi de 3,79%, do manitol de 11,12% e a relação lactulose/manitol de 0,38, com $p < 0,0001$. Os autores concluíram que a permeabilidade intestinal permite maior precisão na correlação clínico-fisiopatológica dos pacientes celíacos dos que o AGA e oferece mais informações para monitorar pacientes com dieta livre de glúten.

Na doença de Crohn (DC), de etiologia desconhecida, uma das hipóteses etiológicas relaciona-se à resposta imunológica alterada ou exagerada por parte do sistema imune da mucosa intestinal a antígenos intraluminais. O envio ou a apresentação do agente ao sistema imunológico da mucosa de maneira que resulte em inflamação, e não em tolerância, pode ser resultado da passagem pela via paracelular, que pode determinar reação inflamatória mais intensa e, associado a outras observações, tem sido aventada a hipótese de que a ruptura da barreira intestinal é o mecanismo central da recidiva na doença inflamatória intestinal.^{65,74}

A diferença na excreção urinária de dissacarídeos e monossacarídeos e do teste de ⁵¹Cr-EDTA detectam mais de 90% dos pacientes com envolvimento de intestino delgado na DC. Os resultados dos testes são afetados pela extensão e atividade da doença e terapia efetiva é marcada por significativa redução na permeabilidade intestinal. Permeabilidade intestinal normal em pacientes portadores de DC tem implicações prognósticas e pode prever bem-estar.⁶⁶

Admite-se que a administração de probiótas pode exercer efeito benéfico sobre a flora intestinal e, conseqüentemente, melhorar a função de barreira exercida pela mucosa intestinal. Assim, Vilela *et al.*⁷⁵ avaliaram a influência do *Saccharomyces boulardii* na permeabilidade intestinal de pacientes com DC em fase de remissão. Em 34 pacientes estudados, divididos em dois grupos randomizados, sendo para o primeiro grupo administrado placebo e para o segundo, o *S.boulardii*, os autores puderam concluir que o *S.boulardii* reduziu as taxas de excreção da lactulose e a relação da excreção entre lactulose e manitol, com melhora da permeabilidade intestinal. Os pacientes com DC, em fase de remissão, apresentam alterações importantes na integridade da mucosa intestinal, por meio do teste da permeabilidade, ocorrendo melhora significativa após a utilização do *S.boulardii*.

Alterações na permeabilidade intestinal podem estar relacionadas à alergia alimentar, na qual alterações na maturação da barreira poderiam ocasionar aumento na exposição a antígenos ingeridos por via oral, determinando resposta inflamatória com a secreção de citocinas, como reação inicial contra o alérgeno. A presença de fator de necrose tumoral e do interferon gama, após testes de desafio com leite de vaca, o aumento do transporte de antígenos alimentares e o aumento do transporte paracelular fortalecem a hipótese de que a resposta inflamatória, resultante da detecção do antígeno, altera a barreira intestinal.⁷⁶

Os testes de permeabilidade intestinal são úteis para documentação de toxicidade intestinal por drogas e toxinas ambientais. Um exemplo é o efeito de anti-inflamatórios não esteróides (AINE's) no intestino delgado. As alterações de permeabilidade em pacientes em uso de AINE's (enteropatia induzida) levam à inflamação do intestino delgado, com sangramento, perda de proteínas, disfunção ileal e estenoses. Alterações de permeabilidade são evidentes em pacientes submetidos à quimioterapia, como veremos a seguir, e medidas de permeabilidade podem levar a um alerta precoce de toxicidade grave iminente. Alcoolistas têm

aumento da permeabilidade intestinal ao $^{51}\text{Cr-EDTA}$, que retorna ao normal após duas semanas de abstenção. As implicações clínicas do aumento da permeabilidade intestinal em alcoolistas são especulativas, mas esses pacientes podem desenvolver um baixo grau de enteropatia, semelhante à dos AINE's.⁶⁶

2.2.5 – Permeabilidade intestinal e DECH

As medidas de permeabilidade intestinal são usadas na monitoração de tratamentos que visam atenuar a lesão à barreira mucosa intestinal, provocada pela quimioterapia do câncer e, de maneira específica, pelos regimes de condicionamento de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênicos ou autólogos. O papel da lesão da mucosa intestinal no desenvolvimento da DECH tem sido enfatizado na literatura.^{66,77,78}

Blijlevens *et al.*^{77,79,80} preconizam que a mucosite, melhor referida como lesão da barreira mucosa (LBM), é um efeito colateral inevitável dos regimes de condicionamento utilizados para TCTH e é um processo complexo, tido hoje como ocorrendo em cinco fases (iniciação, supra-regulação e geração de mensagem, ampliação e sinalização, ulceração e cicatrização), que diminui a qualidade de vida e pode predispor a complicações clínicas mais graves, incluindo infecção disseminada, síndrome de obstrução sinusoidal, DECH e até mesmo a morte.

Radiação e drogas citotóxicas induzem a liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL1) e fator de necrose tumoral alfa e gama (TNF α e TNF γ), de macrófagos e monócitos ativados. A radiação ionizante também induz diretamente a expressão gênica de citocinas. A resposta inflamatória pode ser específica a diferentes classes de agentes quimioterápicos e particularmente à sequência dos regimes preparatórios para TCTH e o dano intestinal manifestado por destruição vilositária, apoptose e perda da borda em escova correlaciona-se bem com os níveis plasmáticos de citocinas. Níveis elevados de citocinas são detectados tão precocemente quanto uma semana após o transplante e podem estar relacionados à pega do enxerto na ausência de complicações ou infecções, eventos não infecciosos e à DECH mais do que propriamente à LBM. Antes da total destruição, IL1, TNF α e TNF γ induzem a modificações maiores na funcionalidade, permeabilidade, transporte através da borda em escova, utilização da glutamina (que é a maior fonte de energia das células intestinais) e integridade das células da mucosa.⁷⁹

As drogas citotóxicas e a radiação interferem nas células de divisão rápida e a cinética da proliferação das células da mucosa influencia a sua sensibilidade a esses agentes. Hiperemia e edema da mucosa e submucosa são usualmente os primeiros sinais de LBM, principalmente devido ao aumento da vascularização e da permeabilidade vascular e estreitamento do epitélio. O processo, usualmente, culmina em ulceração em torno de 14 dias após início da quimioterapia e é também durante essa fase que a microflora residente vai exercer o seu papel. Quando o epitélio intestinal é rompido, ocorre translocação bacteriana e

oligopeptídeos pro-inflamatórios bacterianos, especialmente endotoxinas (LPS), rapidamente ganham acesso. Em geral, o reparo da LBM é paralelo à recuperação hematológica, com resolução completa em torno de duas a três semanas. No entanto, a função do intestino não volta ao normal por várias semanas e má-absorção ou diminuição da atividade enzimática pode persistir após o reparo estrutural.⁷⁹

Juntos, esses dados sugerem um papel da LBM como gatilho para o surgimento da DECH aguda, tanto pela liberação de citocinas quanto pela translocação de toxinas bacterianas.^{77,79,80}

O principal achado da LBM intestinal é a perda da superfície epitelial e mudança na permeabilidade intestinal. Testes de absorção de açúcares mostram que a permeação está aumentada após, apenas, dois dias do tratamento quimioterápico, sugerindo que a liberação de citocinas pode interferir nas junções firmes, mais do que diretamente inibir a proliferação celular, o que tende a ocorrer posteriormente. A alteração da permeabilidade continua em progressão até atingir um pico em torno de sete dias após o final do regime de condicionamento e retorna ao normal em aproximadamente quatro semanas. É possível separar pacientes em risco de desenvolver toxicidade grave à terapia dos pacientes sem risco aumentado, utilizando testes de soluções de açúcares, já que uma correlação positiva entre toxicidade clínica progressiva e aumento da permeabilidade foi encontrada. A utilização destes testes pode auxiliar no uso de regimes de suporte adaptados para pacientes selecionados, na tentativa de reduzir morbidade e talvez, mortalidade.⁷⁷

Blijlevesn *et al.*⁷⁸ estudaram a permeabilidade intestinal, com o uso de testes com açúcares (lactulose e L-ranose), em 129 pacientes que foram submetidos à TCTH autólogo e alogênico e que receberam diferentes regimes de condicionamento mieloablativos. O estudo mostrou que, apesar dos testes de permeabilidade de açúcares não diferenciarem a LBM dos diferentes tipos de regime de quimioterapia, eles puderam determinar o início da ruptura e da disfunção da barreira mucosa do intestino delgado e podem, portanto, serem úteis para o desenvolvimento de testes de intervenção para melhorar ou prevenir esta complicação.

Torres *et al.*⁸¹ utilizou o método de permeabilidade para estudar o efeito do aminoácido glutâmico (glutamina) sobre a barreira mucosa intestinal de pacientes portadores de leucemia submetidos à TCTH. Foram randomizados em dois grupos, 53 pacientes submetidos à TCTH alogênico aparentado, um grupo para receber nutrição parenteral (NP) suplementada com glutamina e o outro, NP padrão. Testes de permeabilidade intestinal com lactulose e manitol foram realizados com o objetivo de mensurar o dano mucoso da terapia de condicionamento. Os testes foram realizados à admissão na unidade de transplantes em 84,9% dos pacientes, no D+6 pós-transplante em 88,7% e no D+14 pós-transplante em 71,7% e não houve diferença nos dois grupos. Todas as medidas de permeabilidade intestinal pioraram progressivamente ao longo do estudo, mas um dado relevante mostra que a relação lactulose/manitol se encontrava em média dois desvios-padrão acima do valor encontrado em controles normais antes do

condicionamento, isto é, à admissão para o transplante. O estudo conclui que a suplementação de glutamina foi eficaz em reduzir a mortalidade em curto prazo desta população selecionada, inclusive com redução na mortalidade relacionada à DECH. Esse efeito não pode ser atribuído à preservação da integridade da mucosa intestinal, já que as medidas de permeabilidade não mostraram diferença nos dois grupos, sendo possível que a glutamina apresente efeito imunomodulatório.

Em 1994, Mahendra *et al.*⁸² descreveram o caso de uma paciente de 38 anos, gênero feminino, portadora de leucemia aguda e submetida à TCTH alogênico, com diagnóstico clínico de DECH aguda intestinal, e que foi submetida a estudos de permeabilidade intestinal com ⁵¹Cr-EDTA e ¹⁴C-manitol além de cintilografia com leucócitos marcados com ^{99m}Tc (tecnécio), com resultados consistentes com inflamação intestinal e DECH intestinal. Os autores concluíram que a utilização de estudos de permeabilidade intestinal poderia contribuir para o diagnóstico da DECH intestinal assim como para avaliar sua extensão e resposta ao tratamento.

Koltun *et al.*⁸³ em 1996, estudaram a hipótese de a DECH aguda intestinal levar a um aumento da permeabilidade intestinal em ratos. A relação da excreção urinária de lactulose e L-ranose administrada por via oral foi quantificada diariamente, durante duas semanas, em ratos com DECH aguda intestinal causada ou por transplante de intestino delgado aparentado ou por injeção intraperitoneal de linfócitos esplênicos aparentados. Um aumento significativo de duas a quatro vezes na relação lactulose/L-ranose foi visto em ambos os grupos, mostrando um aumento na permeabilidade intestinal do hospedeiro, sendo que esse aumento foi atenuado após o tratamento desses animais com ciclosporina A.

Os estudos mostram que a permeabilidade da mucosa intestinal está comprometida em pacientes submetidos à TCTH e vários estudos mostram o benefício da utilização dos testes de permeabilidade intestinal na avaliação da mucosite (LBM). No entanto, não existem estudos na literatura que utilizam os testes de permeabilidade intestinal para diagnóstico da DECH e/ou para avaliação de resposta ao tratamento.

O padrão ouro para diagnóstico da DECH é constituído pelas alterações histopatológicas obtidas de biópsias gástrica, duodenal ou colônica, por meio de procedimentos endoscópicos. Tais exames acarretam frequentemente complicações, como os riscos de hemorragias, em decorrência da plaquetopenia.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos não invasivos para o diagnóstico da DECH gastrointestinal representa sem dúvida, um avanço diagnóstico dessa entidade, possibilitando o início do tratamento mais precoce.

Assim sendo, o projeto de pesquisa apresentado visa promover o diagnóstico mais preciso e precoce da DECH aguda do TGI, que representa uma das maiores complicações do TCTH alogênico, avaliando-se o estudo da permeabilidade do intestino no diagnóstico e

prognóstico dessa entidade, comparando-a com os elementos clínicos, endoscópicos e histopatológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 – Geral

Descrever as alterações clínicas, endoscópicas, histológicas, o índice de apoptose e as medidas de permeabilidade intestinal de pacientes submetidos à TACTH.

3.2 – Secundários

a) Verificar eventuais correlações entre as alterações encontradas e o desenvolvimento de DECH clínica.

b) Descrever as alterações endoscópicas e histopatológicas dos diferentes diagnósticos diferenciais da DECH, de natureza infecciosa (citomegalovírus, adenovirus, infecções fúngicas, *H.pylori* e *Clostridium difficile*).

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 – Pacientes

Foram avaliados 31 pacientes submetidos à TACTH na Unidade de Internação de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), entre agosto de 2007 e maio de 2010. Estes preencheram os critérios de inclusão listados abaixo e que aceitaram participar do estudo após serem informados sobre a pesquisa e receberem as explicações necessárias sobre o estudo e os testes a que seriam submetidos (testes de permeabilidade intestinal e endoscopia digestiva alta ou baixa com biópsias).

Os critérios de elegibilidade foram:

- Pacientes submetidos a transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas aparentado ou não-aparentado, utilizando-se como fonte de células a medula óssea, as células-tronco periféricas ou o sangue de cordão umbilical, com condicionamento mieloablativo ou não-mieloablativo, para tratamento de doenças hematológicas malignas ou não-malignas, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UFMG.
- Idade igual ou superior a 14 anos.
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 4) pelo paciente e seu responsável legal, quando menor de 18 anos.

Os pacientes foram internados e avaliados clinicamente conforme a rotina dos TCTH alogênicos. As rotinas empregadas pela equipe de transplante alogênico estão descritas a seguir:

Condicionamento

Foram utilizados os condicionamentos habituais empregados na unidade de transplantes do HC-UFMG. A combinação de bussulfano e ciclofosfamida foi usada no condicionamento das leucemias agudas e leucemia mielóide crônica, ciclofosfamida (associada ou não a fludarabina e alentuzumabe) para o condicionamento das aplasias medulares graves e a combinação de fludarabina com ciclofosfamida, melfalano ou bussulfano, para os condicionamentos de intensidade reduzida ou não-mieloablativos.

Profilaxia e tratamento da DECH

O enxerto coletado não foi manipulado *in vitro*. A profilaxia da DECH foi feita *in vivo* pelo uso isolado de ciclosporina (CSA) ou pela associação de ciclosporina (CSA) e metotrexato (MTX) ou micofenolato mofetil (MMF). Todas as medicações foram administradas conforme

protocolos do Serviço de Hematologia, em concordância com o regime de condicionamento utilizado pelo paciente. A adaptação ou suspensão da profilaxia foi feita conforme as rotinas do serviço e, em caso de suspensão antes do prazo previsto, usualmente por toxicidade, foi substituída por prednisona, VO, ou metilprednisolona, IV, na dose de 1 mg/Kg/dia.

O tratamento da DECH aguda não é padronizado no Serviço e a escolha foi individualizada. Todos os pacientes receberam dose inicial ou aumento da dose de metilprednisolona para dose de 2 mg/kg/dia, IV, como terapia de primeira linha e a terapia de segunda linha foi feita com o início de drogas adicionais como tacrolimus, metotrexato, micofenolato mofetil (MMF) e anticorpos monoclonais como basiliximabe, daclizumabe ou alemtuzumabe.

Profilaxia de infecções

Os pacientes foram hospitalizados em quartos individuais. A profilaxia antibacteriana não foi utilizada. A profilaxia das infecções por *Pneumocystis jirovesi* foi feita através do uso de sulfametoxazol-trimetropina. A profilaxia antifúngica consistiu no uso de fluconazol desde o início da neutropenia até sua recuperação. A profilaxia antiviral consistiu na administração do aciclovir desde o momento da internação, até a recuperação da neutropenia.

Um protocolo uniforme foi seguido por todos os pacientes para avaliação clínica e realização dos exames complementares:

- À admissão na Unidade de Transplantes: coleta de dados, assinatura do TCLE e estudo de permeabilidade intestinal antes ou durante o regime de condicionamento.
- Pacientes sem sintomas de comprometimento do TGI: avaliação clínica, coleta de dados e estudo de permeabilidade intestinal próximo aos D+14 e D+30 pós-transplante.
- Pacientes com sintomas de comprometimento do TGI (náuseas/vômitos, hiporexia acentuada e diarreia), em qualquer momento entre o D+14 e o D+90 pós-transplante: avaliação clínica e classificação clínica da DECH se presente conforme a *Consensus Conference*,⁵⁵ coleta de dados, realização de endoscopia digestiva alta com biópsias de estômago e duodeno e estudo de permeabilidade intestinal próximo aos D+14 e D+30 pós-transplante. As amostras de biópsias foram enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG.

Foram considerados critérios de exclusão à participação no estudo:

- Idade inferior a 14 anos.
- Realização de transplante autólogo de medula óssea.
- Recusa do paciente em assinar o TCLE.

- Gravidade clínica que não permitia a realização dos procedimentos relacionados ao estudo: choque, insuficiência respiratória, insuficiência renal e distúrbios graves da coagulação.

Os prontuários dos pacientes foram revisados pelo pesquisador para coleta sistemática de dados clínicos e laboratoriais que pudessem, eventualmente, ser úteis na avaliação e discussão dos resultados, conforme protocolo elaborado para o estudo. **4.2 – Avaliação clínica da DECH**

Todos os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados clinicamente do período da internação até a alta hospitalar ou o D+90 pós-transplante, o que viesse primeiro, e foi considerado compatível com diagnóstico clínico de DECH aguda o aparecimento dos sinais/sintomas relatados abaixo, com início após o D+14 pós-transplante.^{14,19}

- Para DECH aguda de pele: exantema maculopapular, podendo ser pruriginoso ou doloroso, com ou sem presença de descamação, acometendo, quando leve, principalmente região retroauricular, pescoço e tronco e/ou região palmo-plantar e, quando grave, eritema difusa com necrose da epiderme e presença de bolhas e descamação;
- Para DECH aguda de fígado: alterações das provas de função hepática e hiperbilirrubinemia direta, compatível com icterícia colestática, com bilirrubina total >2,0 mg/dl;
- Para DECH aguda gastrointestinal: presença de hiporexia ou queixas dispépticas acentuadas, náuseas e/ou vômitos e diarreia com volume superior a 500 ml de evacuação ao dia, com ou sem presença de enterorragia e/ou íleo e/ou dor abdominal.

Os critérios utilizados para estadiamento da DECH aguda foram os revistos pela *Consensus Conference on Acute GVHD Grading*.⁵⁵ Estudo prospectivo de Cahn JY et al⁸⁴ comparando a gradação de Glucksberg que foi validada pela *Consensus Conference*⁵⁵ e a gradação do Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea (IBMTR) não mostrou vantagem de um sistema sobre outro. O estadiamento final do grau clínico da DECH aguda foi feito a partir do estadiamento de cada órgão isolado. Vide tabelas com os critérios para estadiamento no Anexo 2.

Para fins de análise, optamos por reagrupar o estadiamento da DECH em dois grupos:

- DECH aguda clínica leve a moderada, nos pacientes cujo estadiamento final apresentava graus I ou II.
- DECH aguda clínica grave, nos pacientes cujo estadiamento final apresentava graus III ou IV.

4.3 – Testes de permeabilidade intestinal

Os testes da permeabilidade intestinal foram realizados no laboratório do Grupo de Estudos da Barreira Gastrointestinal na Faculdade de Medicina da UFMG, segundo técnica padronizada por Vilela *et al.*⁷³, utilizando-se lactulose e manitol como substratos e quantificando-se a taxa de excreção urinária.

Os pacientes tinham prescrição de jejum absoluto a partir das 24 horas do dia anterior ao exame, com um período de jejum de seis horas e, após eliminar qualquer eventual resíduo urinário, eram orientados a ingerir 120 ml de solução padrão contendo 6,25 g de lactulose cristalina PA a 95%, Sigma-Aldrich® e 3,0 g de manitol cristalino PA, Sigma-Aldrich®. A osmolaridade desta solução é semelhante à plasmática, a fim de se evitar dano ao epitélio intestinal.

Durante as cinco horas subsequentes, a urina do paciente era coletada em frasco vedado para evitar perda e evaporação das substâncias contidas na mesma. Ao final desse período, após verificação do volume final eliminado em cinco horas, uma alíquota de 50 ml de urina era separada em um segundo frasco menor e a ela se adicionava 10 mg de timerosal, para impedir o crescimento bacteriano. Tais amostras eram rotuladas e estocadas em freezer a -20°C.

Para a dosagem das substâncias na urina, foi utilizado o aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) da marca Shimadzu®, composto por uma bomba injetora, um auto-injetor, um controlador integrado a um *software*, que permitia que as leituras fossem interpretadas sob uma plataforma do tipo *workstation*, e um medidor de índice de refração. Pequena quantidade de urina (50) µl, depois de filtrada em filtro milipore e passada por uma resina de troca iônica, era introduzida no aparelho através do auto-injetor. A lactulose e o manitol foram separados pela coluna Phenomenex Rezex RHM-Monossacaride H+® (dimensões: 300 x 7,8 mm) com fase móvel utilizando água milli-Q 100% (pura). Foi utilizada uma pressão de 50 Kgf e injeção de 0,6 mL da amostra biológica (urina) por minuto a partir do qual, pelo princípio físico da refração, se diferenciavam a lactulose e o manitol.

No módulo que operava por refração, diferentes amplitudes de ondas geradas pela solução contendo lactulose e manitol eram captadas e interpretadas pela *workstation* em tempos diferentes, determinados pela separação ocorrida na coluna, o que chamados de tempos de retenção. Tais leituras de amplitude de onda eram então transformadas em elementos gráficos (curvas ou cromatogramas). (Figura 5)

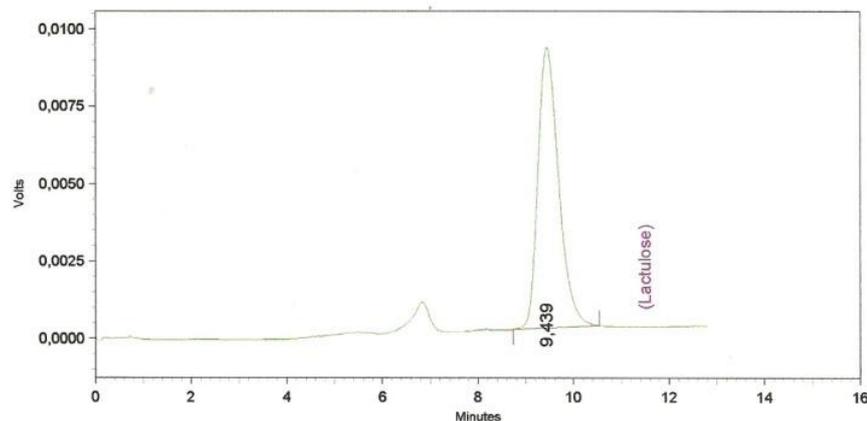
**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
GRUPO DE ESTUDOS DA BARREIRA GASTROINTESTINAL (GREBGI)
TESTE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL**

Nome do paciente: LACTULOSE PADRAO - Phenomenex ant. 24.03.11

Data do exame: 24/3/2011 13:07:13

Nome do Método: C:\CLASS-VP\Methods\Coluna NH2.met

Nome do Arquivo: C:\CLASS-VP\Cromatogramas Controle\LACTULOSE PADRAO - Phenomenex ant. 24.03.11



RID 6A

Pk #	Name	Retention Time	Area	Units
1	Lactulose	9,439	274193	
Totals			274193	

Conclusão:

Porcentagem de excreção da lactulose:

Porcentagem de excreção do manitol:

Relação de excreção:

Figura 5: Cromatograma representando a curva correspondente à taxa de excreção urinária da lactulose.

Para padronização do teste, soluções com quantidades conhecidas de lactulose e manitol foram avaliadas separada e repetidamente no HPLC, permitindo a determinação da equação da reta das mesmas e a obtenção dos números que representavam as áreas sob as curvas. A área sob a curva de cada molécula obtida pela *workstation* corresponde à concentração da substância na urina em g/dl. Em seguida, calculava-se a taxa de excreção da lactulose e do manitol através das seguintes fórmulas:

$$\text{Lactulose: } \frac{L \times \text{vol}(\mu)/1000}{6} \times 100$$

Sendo L a concentração de lactulose na urina em g/dl; vol (μ) o volume urinário obtido em cinco horas e o denominador 6 representando a quantidade total de lactulose ingerida.

$$\text{Manitol: } \frac{M \times \text{vol}(\mu)/1000}{3} \times 100$$

Sendo M a concentração de manitol na urina em g/dl; vol (μ) o volume urinário obtido em cinco horas e o denominador 3 representando a quantidade total de manitol ingerida.

Finalmente, a relação entre a taxa de excreção urinária das duas substâncias era obtida dividindo-se a taxa de excreção da lactulose pela taxa de excreção do manitol.

4.4 – Exames de endoscopia digestiva alta e histologia – padrão de referência

Os exames de endoscopia digestiva alta foram realizados no Setor de Endoscopia Digestiva do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, de acordo com a seguinte rotina:

- a) Preparo do paciente: jejum de oito horas.
- b) Medicação que foi utilizada: dimeticona, 40 gotas, via oral e lidocaína *spray* na orofaringe, imediatamente antes do procedimento. Todos os pacientes, exceto aqueles com contra-indicações clínicas, foram sedados com meperidina e midazolam por via endovenosa, em doses individualizadas.
- c) Os exames foram realizados no Setor de Endoscopia por especialistas do serviço. Foram utilizados gastroscópios padrão, com tubo de inserção de 100cm, diâmetro externo de 9,8mm e diâmetro do canal de biópsias de 2,8mm. Foram usadas pinças de biópsias compatíveis com os endoscópios, com abertura do fórceps entre 0,5mm e 0,7mm.
- d) A desinfecção dos endoscópios foi realizada, conforme rotina do setor, em glutaraldeído a 2% por 20 minutos. As pinças de biópsias foram esterilizadas em autoclave.
- e) Durante a endoscopia as alterações observadas no segmento examinado foram descritas conforme a Classificação de Sidney⁸⁵(Tabela 4). Foram colhidos sistematicamente dois fragmentos de biópsia para estudo histológico da mucosa da segunda porção duodenal, do antro e corpo gástricos.
- f) O material das biópsias foi acondicionado em formol a 10% e encaminhado ao Laboratório de Anatomia Patológica.

Para realização das biópsias, foi definido que a contagem de plaquetas dos pacientes fosse igual ou superior a 50.000/mm³. Os pacientes com contagens inferiores receberam transfusão de concentrado de plaquetas antes do procedimento.

As amostras de tecido gástrico e duodenal armazenadas em formol a 10% foram enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Alfa de Gastroenterologia do HC-UFMG, para serem processadas em parafina e coloração em hematoxilina-eosina (HE); as amostras de biópsias de estômago também foram coradas em Giemsa para pesquisa de *Helicobacter pylori*.

Todas as biópsias foram avaliadas quanto à classificação histológica de Sidney modificada,⁸⁶ e a presença de alterações compatíveis com DECH intestinal foram avaliadas conforme citado no item 2.1.3 e descritas separadamente. O edema foi avaliado conforme intensidade: nenhum, moderado ou grave.

Tabela 4:
Classificação endoscópica – Sistema Sidney⁸⁵

Topografia*	Categoria	Grau de intensidade
Fundo	Enantematosa	Leve
Corpo	Erosiva plana	Moderada
Antro	Erosiva elevada	Grave
	Atrófica	
	Hemorrágica	
	Refluxo	
	Pregas mucosas hiperplásicas	

Termos descritivos

Edema	Nodosidade
Enantema	Hiperplasia de pregas mucosas
Friabilidade	Atrofia das pregas mucosas
Exsudato	Visibilidade do padrão vascular
Erosão plana	Áreas de hemorragia intramural
Erosão elevada	

* quando duas regiões gástricas são afetadas, denomina-se pangastrite, dando ênfase ao segmento mais acometido.

4.5 – Obtenção do índice apoptótico (IA) e imunohistoquímica

4.5.1 - Obtenção do índice apoptótico

O Índice Apoptótico (IA) foi obtido em lâminas coradas por TUNEL,⁸⁷ de maneira cega (e sem prévia informação). A quantificação de células apoptóticas foi realizada por um único observador, considerando-se como critério de inclusão a presença simultânea de pelo menos três das características morfológicas peculiares do processo:

Anoiquia - retração celular e perda de adesões entre células e membrana basal.

Condensação citoplasmática e nuclear - compactação da cromatina nuclear em massas densas uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear, às vezes formando imagens de crescentes.

Fragmentação nuclear - convolução e fragmentação da membrana nuclear – sem cariorrexe ou ruptura.

Fragmentação celular – com formação dos corpos apoptóticos.

O IA foi determinado pela seguinte fórmula:

$$(IA) = (\Sigma n^{\circ} \text{ de células apoptóticas} / \Sigma n^{\circ} \text{ de células totais}) \times 100$$

Para a validação dos critérios morfológicos da quantificação do IA e da técnica de TUNEL⁸⁷ (Apoptag[®] Peroxidase *in situ*, Apoptosis Detection Kit, Cat S7100, Chemicon), foi realizada também imunohistoquímica para Bax (Mouse x Bax, Invitogen, Cat.#18-0218).

4.5.2 – Detecção *in situ* de apoptose: método de TUNEL⁸⁷ – *TdT-mediated DNTP Nick end labeling*.

a) Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico e para permitir a penetração do tampão contendo TdT e nucleotídeos marcados, foi feita a aplicação de Proteinase K (2mg/ml) diluída em PBS na proporção de 1:100 durante 20 minutos.

b) Para o bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se o peróxido de hidrogênio (30 vol.) diluído em metanol na proporção de 1:2 durante 30 minutos. Após a remoção do excesso da solução ao redor do corte, as lâminas foram cobertas com tampão de equilíbrio por 10 minutos e, em seguida, incubadas em câmara úmida a 37°C com 100µl de enzima TdT diluída durante uma hora.

c) Foram lavadas por três vezes com PBS e os cortes foram cobertos com 100µl de tampão de parada, agitados por 15 segundos e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente.

d) Os cortes foram incubados em câmara úmida à temperatura ambiente com 100µl do antidigoxigenina conjugado por 30 minutos.

e) A revelação foi efetuada com DAB + *Substrate Chromogen System* (DAKO Corporation[®], Carpinteria, USA, Cat.K3768) e a contracoloração com Hematoxilina de Harris (Sigma Chemical[®], USA), durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

f) Após desidratação em álcool etílico absoluto e imersão em xilol, as lâminas foram montadas com Enthelan e, posteriormente, examinadas em microscópio de luz.

4.5.3 – Avaliação da apoptose pela expressão da proteína Bax

a) As lâminas foram desparafinadas em estufa a 58°C e submersas em xilol I e II, 90%, 80% e 70% e lavadas em solução salina de PBS por cinco minutos.

b) Foi feita a recuperação antigênica com solução de tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos, em banho-maria, à temperatura de 93°C. Após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada.

c) Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena gotejando-se o reagente *peroxidase block* sobre os cortes e, incubando-se por 15 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e, posteriormente, em solução tampão de lavagem por cinco minutos, à temperatura ambiente.

d) Secou-se ao redor dos cortes e aplicou-se o anticorpo primário biotilado (anticorpo monoclonal produzido em camundongo para *Bax clone 2D2 Invitrogen*) e incubou-se por 12 horas em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após, foram feitas duas lavagens em solução tampão por cinco minutos cada.

e) Secou-se ao redor dos cortes e aplicou-se o complexo estreptavidina-peroxidase e incubaram-se as lâminas em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. As secções foram depois lavadas duas vezes em tampão.

f) Secou-se ao redor dos cortes, aplicou-se do DAB (diaminobenzidina) e incubou-se por cinco minutos, à temperatura ambiente.

g) Foram lavadas em água destilada corrente e contra-coradas com hematoxilina e montadas com Ethelan.

O kit utilizado para essa técnica foi o Novocastra[®] (Peroxidase Detection Systems – R712). A diluição utilizada de cada anticorpo foi de 1:200.

Além da marcação específica (grumos castanhos amarronzados no citoplasma), foram consideradas características morfológicas de apoptose: retração celular com projeções digitiformes da membrana, anoiquia e formação de corpos apoptóticos; convolução e fragmentação da membrana nuclear e a compactação da cromatina em massas densas uniformes alinhadas no lado interno da membrana nuclear.

4.5.4 – Análise morfométrica

Para o estudo morfométrico, imagens digitais das lâminas histológicas foram adquiridas utilizando o sistema de vídeo-câmara acoplado ao microscópio de luz Olympus CH30 com

objetiva de 40x para a realização da contagem de células em apoptose e determinação do IA. As imagens foram transferidas pelo sistema de vídeo-câmara a um computador e capturadas através do Software Honestech TVR 2.5. A aquisição de imagens foi realizada no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG. A quantificação do IA foi realizada através do analisador de imagens Media Cybernetics Image Pro-Plus, versão 4.0.

Em relação ao índice apoptótico foram realizadas diversas comparações, a fim de avaliar possíveis diferenças entre paciente com DECH em seus diversos graus quanto ao IA. Foram realizadas também comparações do IA relativamente aos achados histológicos, endoscópicos e à mortalidade. Em relação a esse desfecho, sua análise deveu-se ao fato de que a DECH aguda é a principal causa de óbito em pacientes submetidos a TACTH. Nesse sentido, Socie et al.⁶⁰ correlacionou apoptose e mortalidade ao D+90.

4.6 – Análise estatística

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados criado no programa EpiData 3.1. Os dados referentes ao estudo da permeabilidade intestinal foram analisados utilizando-se o programa SPSS versão 13.0 e os dados referentes ao índice de apoptose foram analisados utilizando-se o programa Graph Pad Prisma versão 5.0.

4.7 – Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), parecer número ETIC 092/07 (Anexo 1). Todos os pacientes leram e assinaram o TCLE.

5 – RESULTADOS

5.1 – Pacientes

Foram incluídos 31 pacientes no estudo, admitidos para realização de TACTH.

Dos 31 pacientes, 16 eram do sexo feminino (51,6%). A idade variou entre os 14 e os 58 anos ($31,35 \pm 9,09$ anos). Em relação ao diagnóstico, nove pacientes (29%) apresentavam patologias não malignas, oito (25,8%) apresentavam patologias malignas de baixo risco e 14 (45,2%) apresentavam patologias malignas de alto risco, sendo considerado como de baixo risco pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) em primeira fase crônica, leuquemias agudas em primeira remissão e mielodisplasia com anemia refratária com ou sem sideroblastos em anel, enquanto que pacientes de alto risco apresentavam LMC em fase acelerada ou blástica, leuquemias agudas em segunda ou terceira remissão ou refratárias ou mielodisplasia que não anemia refratária.⁸¹ Vinte e sete pacientes (87,1%) foram submetidos à TCTH aparentado e quatro pacientes (12,9%) à TCTH não-aparentado. O regime de condicionamento foi mieloablativo em 21 pacientes (67,7%) e não-mieloablativo em 10 (32,3%).⁸⁸ A profilaxia para DECH foi realizada com CSA e MTX em 17 pacientes (54,8%), com CSA e MMF em dois (6,5%) e com CSA isolada em 12 (38,7%)⁸⁹. Como fonte de células-tronco foi utilizada medula óssea em 10 pacientes (32,3%), células-tronco periféricas em 19 (61,3%) e células de cordão umbilical em dois (6,5%).

Vinte e cinco pacientes (80,6%) apresentaram quadro clínico de mucosite, que foi classificada de acordo com os critérios de toxicidade da ECOG,⁹⁰ sendo 10 pacientes (32,25%) com mucosite leve a moderada (graus 0,1 e 2) e 15 (48,38%) com mucosite grave (graus 3 e 4). Dos 25 pacientes, 11 (44%) necessitaram em pelo menos um momento de nutrição enteral e parenteral. Cinco pacientes (20%) receberam apenas nutrição enteral e um caso (4%) recebeu apenas nutrição parenteral.

Para fins de análise das alterações encontradas à endoscopia, histologia e permeabilidade intestinal, os pacientes foram separados em dois grupos:

O Grupo 1 era composto de 11 pacientes (35,5%) que apresentaram diagnóstico clínico de DECH aguda e o Grupo 2 era composto de 20 pacientes (64,5%) sem diagnóstico clínico de DECH aguda. Todos os 11 pacientes com diagnóstico clínico de DECH aguda apresentaram quadro clínico de DECH gastrointestinal (vide estadiamento em Tabelas 6 e 7), sendo que cinco apresentaram DECH aguda de pele e quatro apresentaram DECH aguda de fígado, concomitantemente à DECH intestinal, com três pacientes apresentando acometimento dos três órgãos.

Não houve diferença estatística entre sexo, idade, diagnóstico, tipo de transplante, regime de condicionamento, fonte de células e profilaxia da DECH nos dois grupos analisados, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5
Características demográficas, de diagnóstico e de tratamento dos pacientes analisados

		DECH clínica pos n=11 (35,5%)	DECH Clínica neg n=20 (64,5%)
Sexo	F	7 (63,6%)	9 (45,0%)
	M	4 (36,4%)	11 (55,0%)
Idade (anos)	Idade (média)	14 – 53 (35,8)	15 – 58 (28,9)
Diagnóstico	Não maligna	2 (18,2%)	7 (35,0%)
	Maligna baixo risco	1 (9,1%)	6 (30,0%)
	Maligna alto risco	8 (72,7%)	7 (35,0%)
TACTH	Aparentado	10 (90,9%)	17 (85,0%)
	Não aparentado	1 (9,1%)	3 (15,0%)
RC	Mieloablativo	7 (63,6%)	14 (70,0%)
	Não mieloablativo	4 (36,4%)	6 (30,0%)
Profilaxia DECH	CSA	4 (36,4%)	8 (40,0%)
	CSA/MTX	5 (45,4%)	12 (60,0%)
	CSA/MMF	2 (18,2%)	0
FC	MO	2 (18,2%)	8 (40,0%)
	CTP	8 (72,7%)	11 (55,0%)
	Cordão	1 (9,1%)	1 (5,0%)
Mucosite	Ausente	2 (18,2%)	4 (20,0%)
	Leve/moderada	2 (18,2%)	8 (40,0%)
	Grave	7 (63,6%)	8 (40,0%)

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; pos=presente; neg=ausente; F=sexo feminino; M=sexo masculino; TACTH=transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; RC=regime de condicionamento; CSA=ciclosporina A; MTX=metotrexato; MMF=micofenolato mofetil; FC=fonte de células; MO=medula óssea; CTP=células-tronco periféricas.

Tabela 6

Estadiamento clínico geral dos pacientes com diagnóstico de DECH aguda

	Estadiamento clínico	
	N	%
Leve – grau I	0	0,0%
Moderado – grau II	2	18,2%
Grave – graus III e IV	9	81,8%
TOTAL	11	100,0%

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro.

Tabela 7

Estadiamento clínico de cada órgão isolado dos pacientes com diagnóstico de DECH aguda

Estadiamento clínico	Grau TGI	Grau Pele	Grau fígado
Grau I	2 (18,8%)	3 (60,0%)	1 (25,0%)
Grau II	2 (18,8%)	-	-
Grau III	3 (27,3%)	1 (20,0%)	2 (50,0%)
Grau IV	4 (36,4%)	1 (20,0%)	1 (25,0%)
Total	11 (100,0%)	5 (100,0%)	4 (100,0%)

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; TGI=trato gastrointestinal.

Treze dos 31 pacientes (41,9%) foram a óbito no período do estudo, com os óbitos acontecendo entre o D+8 e o D+66 pós-transplante, com mediana de 37 dias. Quatro óbitos (36,4%) ocorreram no Grupo 1 (n=11), três por DECH aguda grau IV de TGI e um por infecção, esse também com diagnóstico de DECH aguda grave, e nove óbitos (45,0%) no Grupo 2 (n=20), sendo quatro por SOS, quatro por insuficiência respiratória (síndrome de angústia respiratória do adulto - SARA) e um por infecção/sepsis.

5.2 - Alterações endoscópicas

Quinze pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta no período até o D+90 pós-transplante com um total de 21 esofagogastroduodenoscopias. Alterações endoscópicas visíveis foram observadas em 11 das 21 (52,4%) endoscopias realizadas. As anormalidades da mucosa mais comumente encontradas foram erosões e úlceras esofageanas, gastrite enantematosa de moderada intensidade, áreas de hemorragia subepitelial no corpo, erosões em antro e pangastrite acentuada com presença de micronodularidade, duodenite erosiva, duodenite enantematosa, aspecto serrilhado da mucosa e petéquias duodenais (número de biópsias analisadas: esôfago n=3; estômago n=7; duodeno n=6). Outro encontro foi o de monilíase esofageana em um paciente.

Não foram realizadas endoscopias digestivas baixas nos pacientes estudados.

A correspondência entre a suspeita clínica de DECH, no momento da realização do exame e as observações endoscópicas sugestivas, foi positiva em 10 dos 21 (47,6%) e negativa em seis dos 21 (28,6%) procedimentos realizados, sendo que não houve significância estatística. (Tabela 8).

Tabela 8

Correspondência entre o diagnóstico clínico de DECH aguda e as alterações endoscópicas e histológicas pós-TACTH

		DECH clínica pos	DECH clínica neg	<i>P</i>
Endoscopia (n=21)	pos	10 (47,6%)	1 (4,76%)	0,149
	neg	6 (28,6%)	4 (19,04%)	
Histologia (n=19)	pos	4 (21,05%)	0	0,530
	neg	11 (57,90%)	4 (21,05%)	

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; TACTH=transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; pos=positivo; neg=negativo.

5.3 - Alterações histológicas

Não foram realizadas biópsias em dois procedimentos, devido a sinais evidentes de sangramento. Biópsias de esôfago foram realizadas somente quando da hipótese de infecção viral ou fúngica.

As alterações histológicas sugestivas de DECH mais frequentemente encontradas, no estômago (n=3), foram presença de infiltrado inflamatório predominantemente leucocitário, necrose do epitélio glandular, aumento da apoptose e presença de corpúsculos apoptóticos e, no duodeno (n=3), presença de atrofia e ulceração da mucosa, vilosidades achatadas com diminuição da relação vilosidade:cripta, vacuolização celular, áreas de erosão, atipias regenerativas nas criptas e frequentes alterações nucleares com aumento da apoptose, além da presença de infiltrado inflamatório granulomononuclear, congestão e áreas de hemorragia.

Tabela 9

Correspondência entre as alterações endoscópicas e histológicas

	Histologia pos	Histologia neg	Total	<i>P</i>
Endoscopia pos	1 (25,0%)	10 (66,7%)	11(58,0%)	0,262
Endoscopia neg	3 (75,0%)	5 (33,3%)	8 (42,0%)	
Total	4 (100,0%)	15 (100,0%)	19 (100,0%)	

pos=positiva; neg=negativa.

A correspondência entre alterações endoscópicas sugestivas de DECH e a confirmação histológica ocorreu em apenas uma das 19 endoscopias em que foi realizada biópsia como mostrado na Tabela 9. Somente quatro das 19 amostras (21%) de biópsia apresentaram diagnóstico histológico de DECH, sendo que esses quatro pacientes

apresentavam suspeita clínica no momento do exame. (Tabela 8). Em cinco pacientes com suspeita clínica, foram observados sinais de gastrite crônica discreta e inespecífica ou duodenite crônica em atividade, ambos de etiologia não determinada à histologia.

Outras alterações histológicas que não a presença de sinais sugestivos de DECH foi a presença de monilíase esofageana (n=1), de *Helicobacter pylori* no estômago (n=1) e de inclusões sugestivas de citomegalovirose em biópsias de estômago (n=2) e duodeno (n=1).

5.4 - Índice apoptótico

A análise do índice apoptótico (IA) e os estudos de imunohistoquímica foram realizados em apenas nove pacientes devido ao fato das amostras de biópsias disponíveis não contemplarem uma área representativa, isto é, um número de campos suficientes para análise e referência estatística, principalmente devido à presença de artefatos e fragmentação. O IA foi calculado em 10 campos para cada paciente e os valores de IA variaram de 3,791% a 24,51%. A média dos 10 campos analisados para cada paciente foi de 6,503% a 11,92% e a mediana de 6,198% a 12,43%. (veja Tabelas 10 e 11 no Anexo 5).

As Figuras 6 a 8 mostram a tela do computador com programas de análise de imagens (Image Pro Plus versão 4.5), utilizado para cálculo dos índices apoptóticos. As Figuras 9 a 11 mostram a mucosa do trato gastrointestinal de um paciente onde se vê células inflamatórias em apoptose demonstrando fragmentação do DNA/TUNEL e as Figuras 12 e 13 mostram a mucosa do TGI com células inflamatórias em apoptose expressando a proteína BAX.

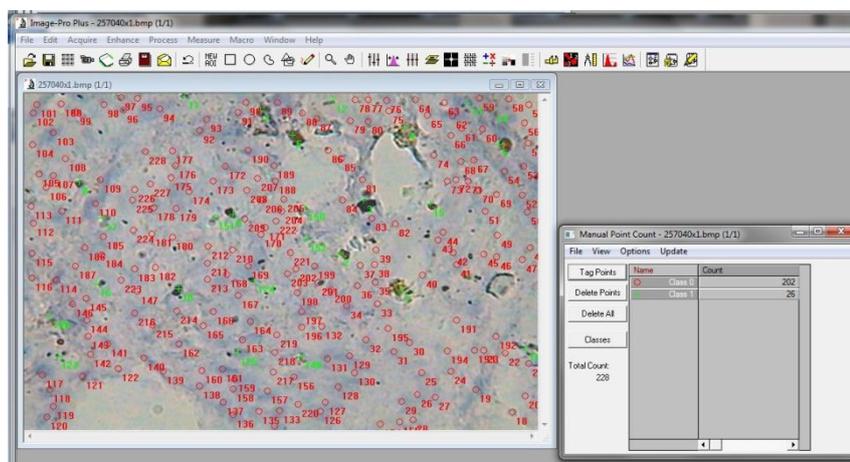


Figura 6 - Tela do computador com programas de análise de imagens (Image Pro Plus versão 4.5), utilizado para cálculo dos índices apoptóticos.

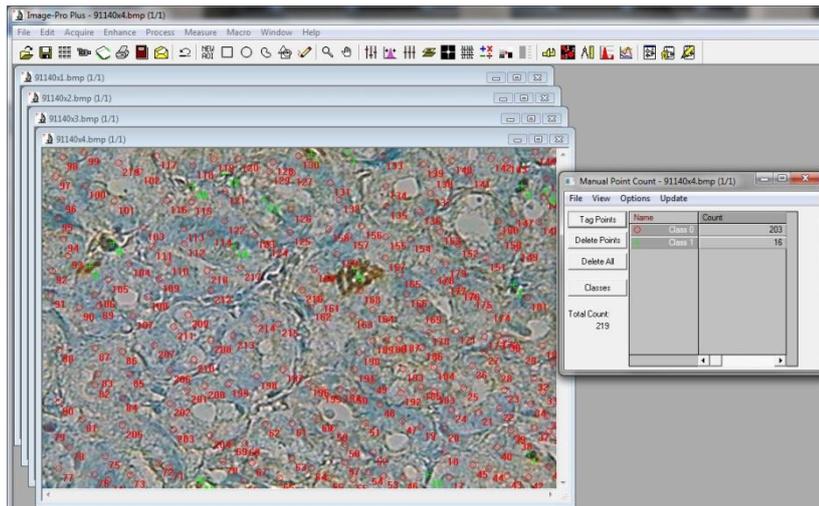


Figura 7 - Tela do computador com programas de análise de imagens (Image Pro Plus versão 4.5), utilizado para cálculo dos índices apoptóticos.

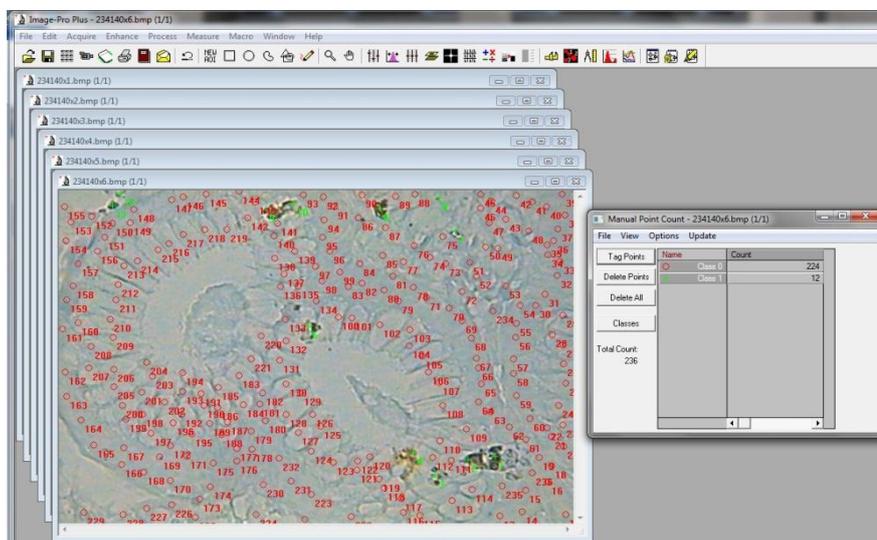


Figura 8 - Tela do computador com programas de análise de imagens (Image Pro Plus versão 4.5), utilizado para cálculo dos índices apoptóticos.

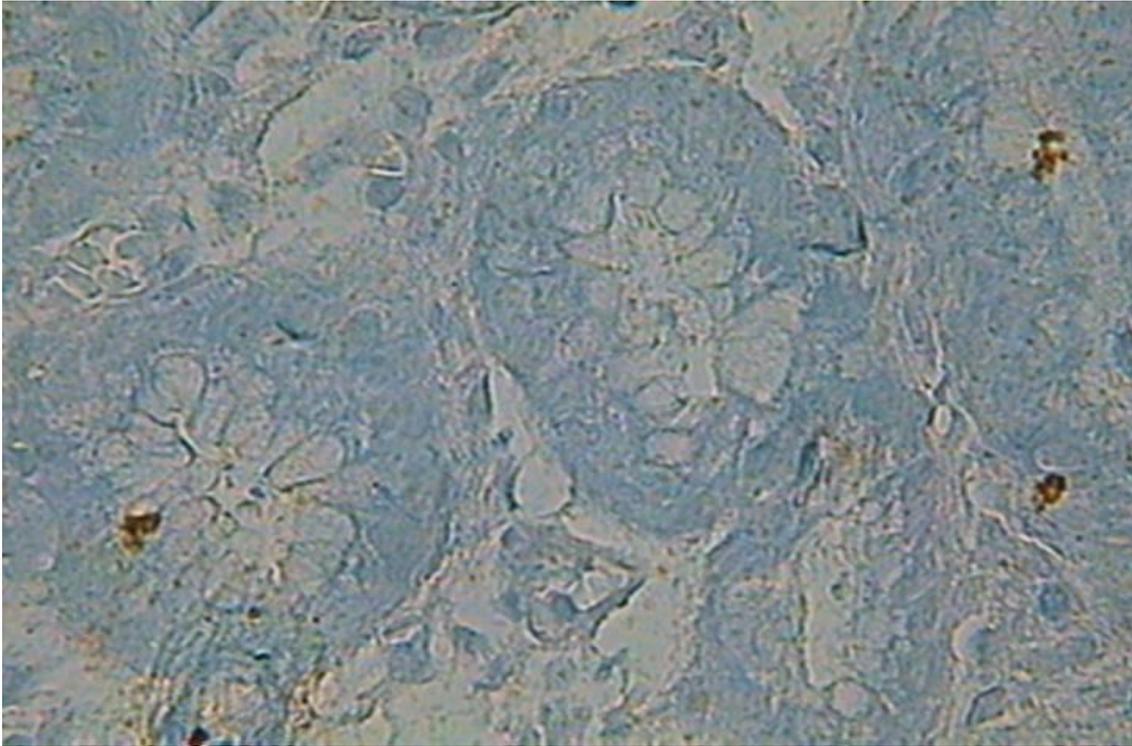


Figura 9: Células inflamatórias em apoptose demonstrando fragmentação do DNA/TUNEL (Objetiva 40X).

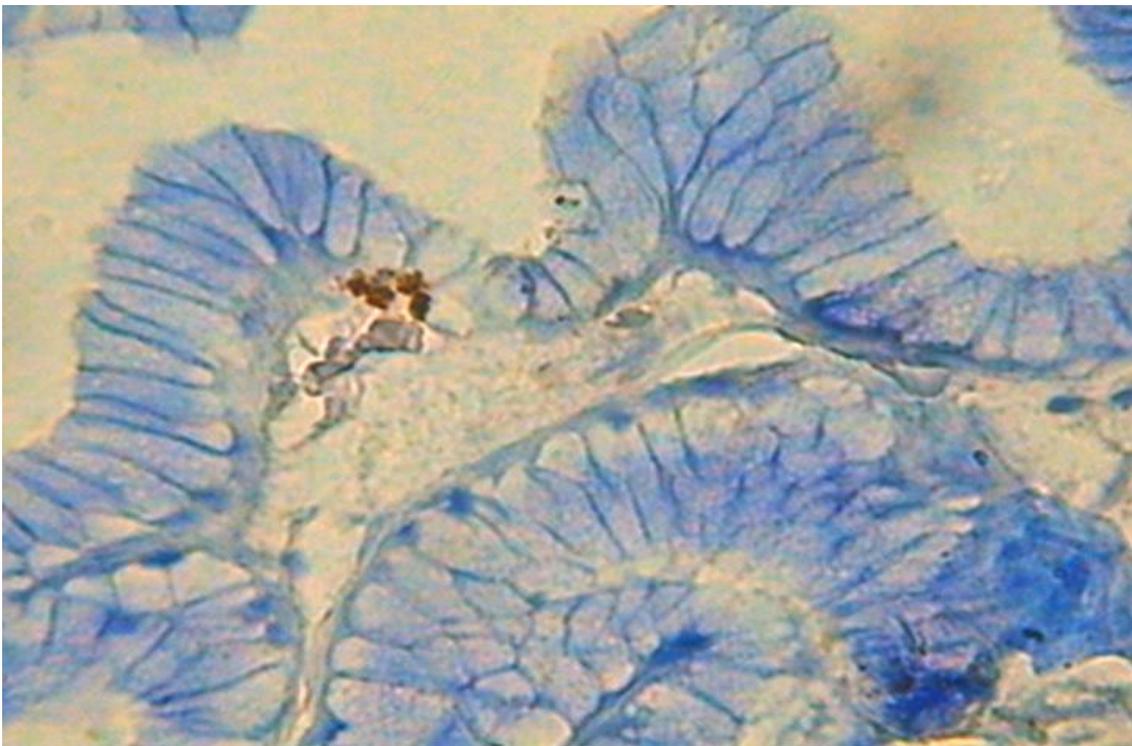


Figura 10: Células inflamatórias em apoptose demonstrando fragmentação do DNA/TUNEL (Objetiva 40X).

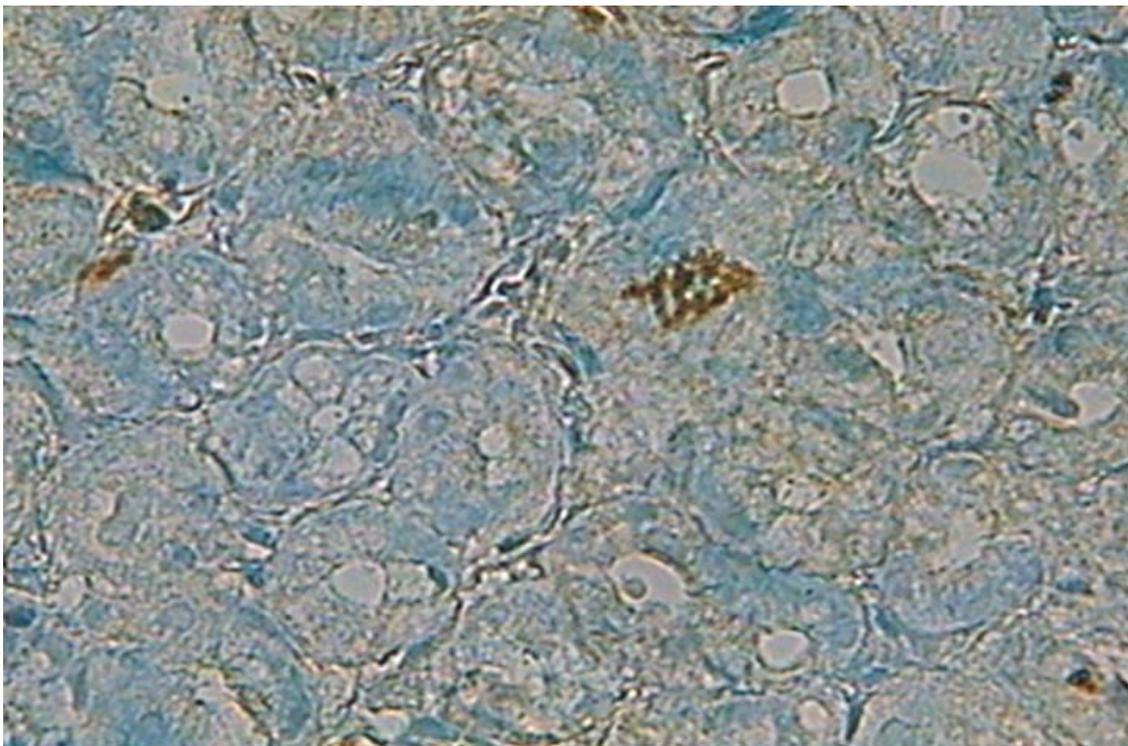


Figura 11: Células inflamatórias em apoptose demonstrando fragmentação do DNA/TUNEL (Objetiva 40X).

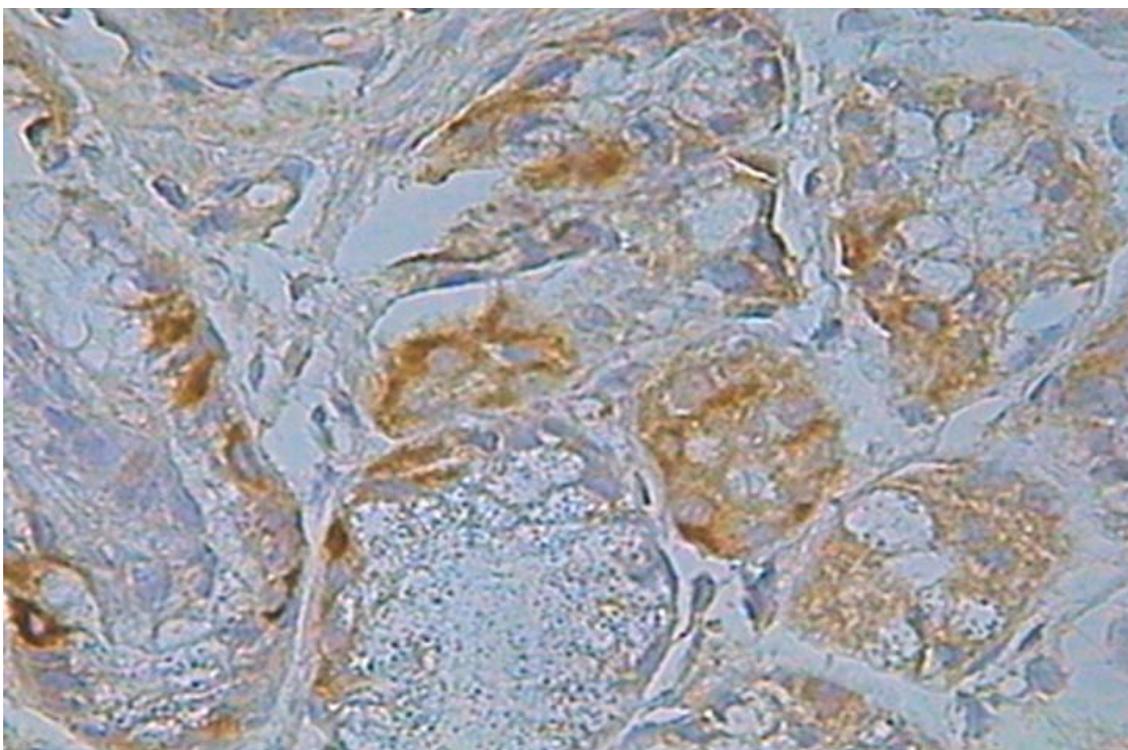


Figura 12: Mucosa do trato gastrointestinal. Células inflamatórias em apoptose expressando a proteína Bax (Imunohistoquímica para Bax).

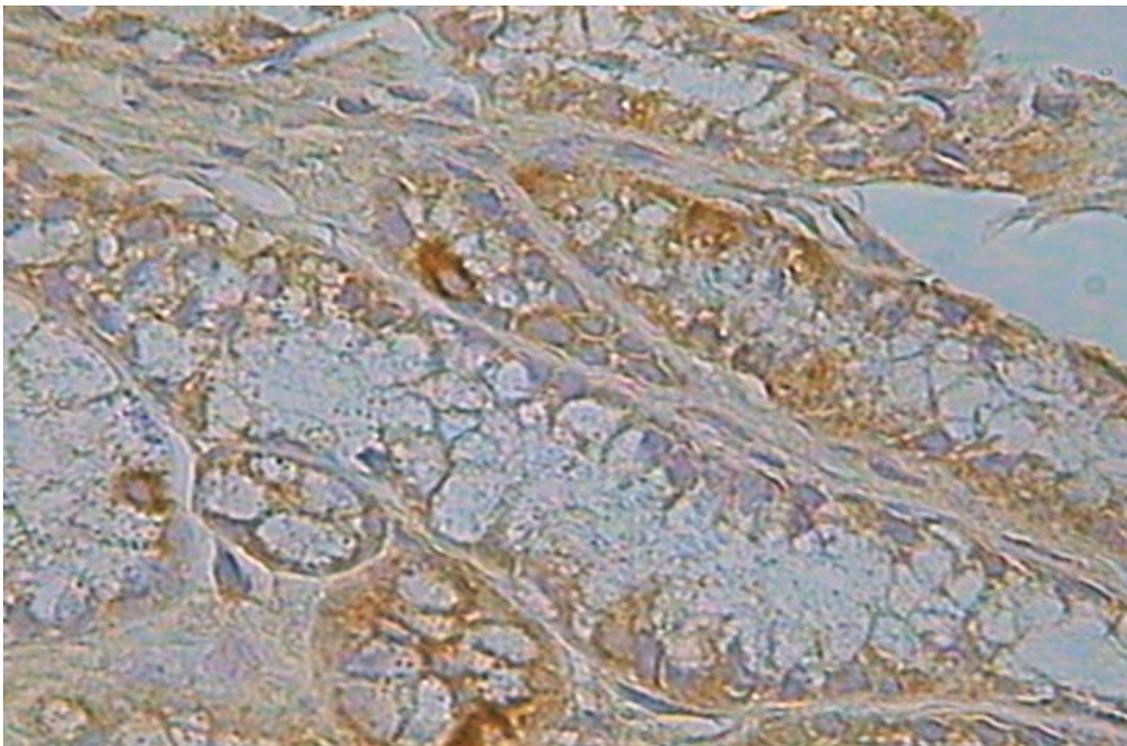


Figura 13: Mucosa do trato gastrointestinal. Células inflamatórias em apoptose expressando a proteína Bax (Imunohistoquímica para Bax).

O IA foi avaliado em relação aos óbitos, por DECH ou por MRT, estadiamento da DECH, diagnóstico endoscópico e diagnóstico histológico sendo que não houve significância estatística, possivelmente devido ao tamanho reduzido da amostra. As Tabelas 12 a 16 mostram os resultados, juntamente com as Figuras 14 a 18.

Tabela 12
Comparação entre os valores da mediana do IA e óbitos

	Óbitos sim	Óbitos não	<i>P</i>
IA	8,10%	7,20%	0,1384

IA=índice apoptótico.

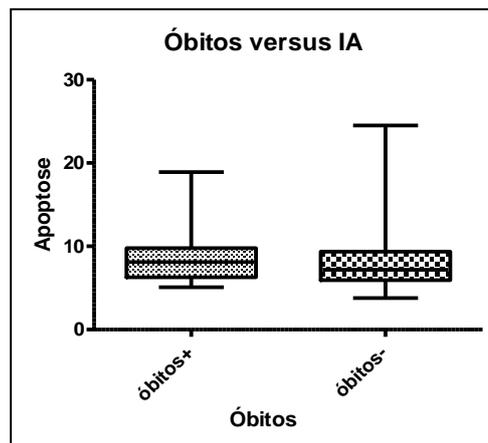


Figura 14: Gráfico de comparação entre a média do IA dos óbitos e não-óbitos.

Tabela 13
 Comparação entre os valores do IA e os óbitos por DECH, óbitos por MRT (não-DECH) e pacientes vivos

	Óbitos por DECH	Óbitos por MRT	Vivos	<i>P</i>
IA	9,056%	7,964%	7,202%	0,1582

IA=índice apoptótico; DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; MRT=mortalidade relacionada ao transplante.

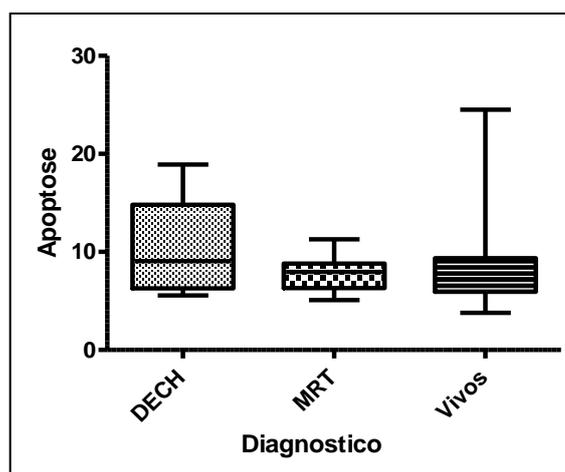


Figura 15: Gráfico com os resultados da comparação entre os IA dos óbitos por DECH, óbitos por MRT e pacientes vivos.

No teste de comparação múltipla de Dunn entre os óbitos por DECH *versus* óbitos por MRT, óbitos por DECH *versus* vivos e óbitos por MRT *versus* vivos não houve significância estatística

Tabela 14
Comparação entre os valores do IA e a gravidade clínica da DECH aguda intestinal

Grau da DECH intestinal	IV	III	II	I	Ausente	<i>P</i>
IA	9,056%	6,987%	8,394%	8,729%	6,701%%	0,0539

IA=índice apoptótico; DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro

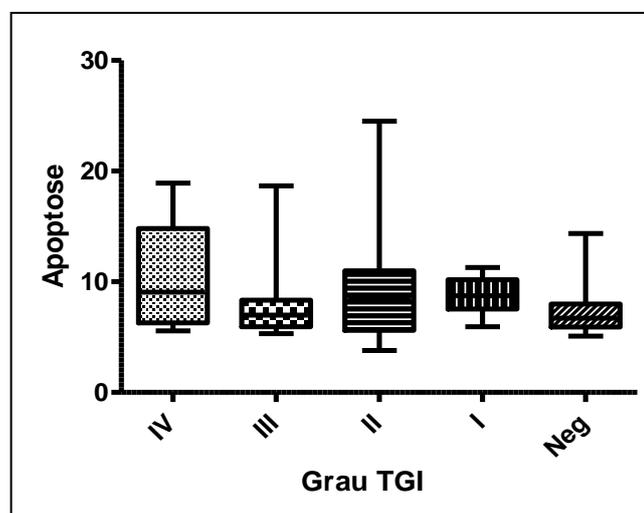


Figura 16: Gráfico dos resultados do IA nos diferentes graus de estadiamento clínico da DECH aguda do TGI dos pacientes do estudo.

No teste de comparação múltipla de Dunn entre os resultados do IA, os diferentes graus de acometimento do TGI e os pacientes sem DECH, não houve diferença estatística.

Tabela 15
Comparação entre os valores do IA e o resultado da EDA

	EDA pos	EDA neg	<i>P</i>
IA	8,211%	7,157%	0,0392

IA=índice apoptótico; EDA=endoscopia digestiva alta; pos=positiva; neg=negativa.

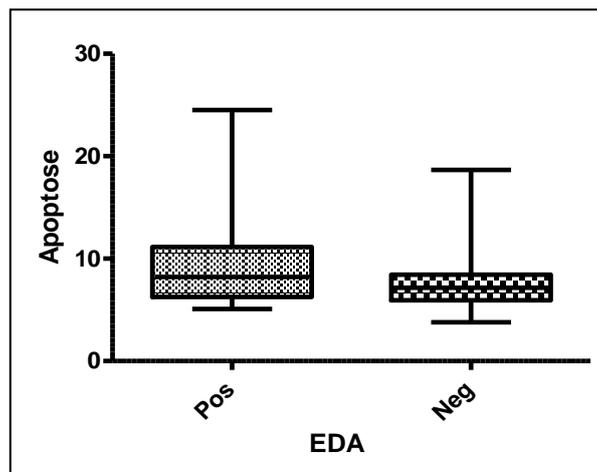


Figura 17: Gráfico comparando os resultados dos IA com os da EDA

Tabela 16
Comparação entre os valores do IA e o resultado da HISTOLOGIA

	Histologia pos	Histologia neg	<i>P</i>
IA	7,730%	7,894%	0,3803

IA=índice apoptótico; pos=positiva; neg=negativa.

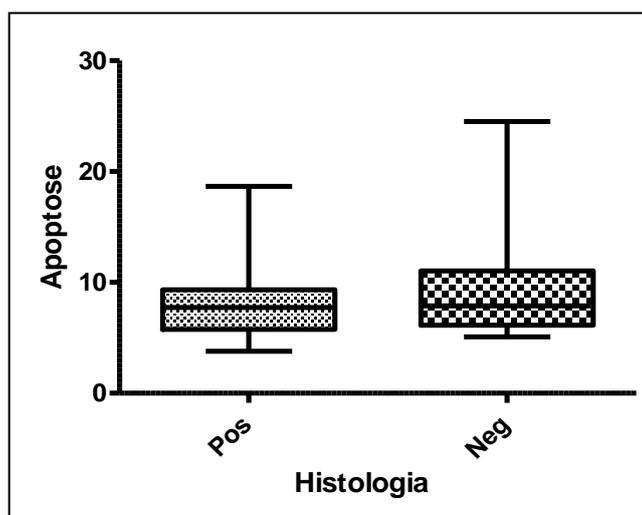


Figura 18: Gráfico comparando os resultados dos IA com os da HISTOLOGIA

5.5 - Permeabilidade intestinal

Dos 31 pacientes incluídos no estudo, 25 (80,64%) realizaram a avaliação de permeabilidade intestinal na fase pré-transplante, 21 (67,74%) realizaram a avaliação em torno do D+14 pós-transplante e 11 (35,48%) realizaram em torno do D+30 pós-transplante, sendo que apenas nove (29,0%) conseguiram realizar o exame nos três períodos, conforme programado inicialmente.

Os resultados dos testes de permeabilidade intestinal foram analisados utilizando-se a relação entre as taxas de excreção urinária da lactulose e do manitol (R L/M) e utilizando-se como ponto de corte a média \pm 2 desvios padrão de um grupo de 16 controles sadios (Anexo 6), que foi determinada como 0,0119. Consideramos como alterada a R L/M dos pacientes que se encontrava acima desse ponto de corte, e como normal a R L/M dos pacientes abaixo desse ponto de corte.

Os resultados da associação entre as R L/M 1,2 e 3 e DECH clínica estão na Tabela 17, sendo que não houve significância estatística.

Tabela 17

Correspondência entre o diagnóstico clínico de DECH aguda e a permeabilidade intestinal no período pré-TACTH e nos D+14 e D+30 pós-TACTH

		DECH clínica pos	DECH clínica neg	P
R L/M 1 [#] (n=25)	pos	4 (40,0%)	2 (13,3%)	0,175
	neg	6 (60,0%)	13 (86,7%)	
R L/M 2* (n=20)	pos	6 (66,7%)	6 (54,5%)	0,670
	neg	3 (33,3%)	5 (45,5%)	
R L/M 3 [§] (n=11)	pos	2 (40,0%)	1 (16,7%)	0,545
	neg	3 (60,0%)	5 (83,3%)	

R L/M 1[#]=exame colhido na fase pré-TACTH; R L/M 2*=exame colhido no D+14 pós-TACTH;
R L/M 3[§]=exame colhido no D+30 pós-TACTH.

TACTH=transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; pos=positivo; neg=negativo.

Como em algumas situações o valor da lactulose se encontrava indetectável, isto é, abaixo do nível de detecção do aparelho que é de 0,01%, quando o valor da R L/M encontrava-se acima do ponto de corte estabelecido, esse dado era descartado da análise estatística, pois o percentual de detecção poderia se encontrar em qualquer ponto entre zero e 0,01%. Entretanto, como o limite mínimo de detecção de 0,01% é o numerador da R L/M, quando o resultado se encontrava abaixo do ponto de corte, o dado era utilizado. A Tabela 18 mostra os resultados da R L/M pré-TACTH e dos D+14 e D+30 pós-TACTH dos pacientes estudados.

Tabela 18
Resultados da R L/M pré-TACTH e dos D+14 e D+30 pós-TACTH dos 31 pacientes estudados.

Casos	Permeabilidade Intestinal		
	R L/M 1	R L/M 2	R L/M 3
1	0,0083	0,0045	-
2	0,0478 [#]	0,0544 [#]	0,347 [#]
3	0,033 [#]	0,0047	0,0028
4	0,001	0,007	0,005
5	-	0,043 [#]	0,025 [#]
6	0,0059	0,002	-
7	0,0107	0,86 [#]	-
8	0,0103	0,165 [#]	-
9	0,0008	-	-
10	0,0823 [#]	-	-
11	0,0023	0,002	-
12	0,0125 [#]	0,0383 [#]	-
13	0,00069	0,0025	-
14	-	0,0255 [#]	-
15	0,0042	-	-
16	0,0006	0,285 [#]	1,142 [#]
17	-	-	-
18	0,00052	0,0013	0,0054
19	0,0033	-	-
20	-	-	0,0022
21	0,0014	0,0126 [#]	-
22	0,008	0,0464 [#]	0,0107
23	-	-	-
24	0,0273 [#]	-	-
25	0,0115	0,0285 ^{#§}	0,0018
26	0,0066	0,0009	0,0028
27	0,0112	-	-
28	0,004	0,227 [#]	-
29	0,0021	0,019 [#]	-
30	0,02 [#]	0,034 [#]	0,001
31	-	-	-
Média	0,0127	0,091755	0,140518
Desvio padrão	0,018479	0,197626	0,347591

[#] Exames acima do limite de corte estabelecido como alterado, de 0,0119, que é a média + 2 desvios-padrão de uma população controle (Anexo 6)

[§] Dado excluído da análise pelo fato do valor da lactulose estar abaixo do nível de detecção do aparelho que é de 0,01% e, portanto o percentual de detecção poderia se encontrar em qualquer ponto entre zero e 0,01%.
 R L/M=relação lactulose/manitol; TACTH=transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas; R L/M 1=realizada no pré-TACTH; R L/M 2=realizada no D+14 pós-TACTH; R L/M 3=realizada no D+30 pós-TACTH.

5.6 - Mucosite

Sabendo da relação entre a presença de lesão da mucosa do TGI na fase de condicionamento e o desenvolvimento de DECH aguda, analisamos a associação entre mucosite grave e DECH aguda (Tabela 19), mas o resultado também não apresentou significância estatística nos pacientes estudados.

Tabela 19

Relação entre a presença de mucosite grave e DECH clínica.

	DECH clínica pos	DECH clínica neg	<i>P</i>
Mucosite grave	7 (63,6%)	8 (40,0%)	0,37
Mucosite ausente, leve ou moderada	4 (36,4%)	12 (60,0%)	

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; pos=positivo; neg=negativo.

6 – DISCUSSÃO:

O TACTH é utilizado como terapia curativa de um grande número de doenças hematológicas malignas e não-malignas, síndromes de falência medular e de algumas desordens hereditárias do metabolismo. Por outro lado, a DECH é a maior causa de mortalidade desse procedimento não relacionada à recidiva da doença de base. Apesar de, na última década, ter ocorrido um declínio na frequência de falência orgânica, infecção e DECH aguda grave como causa de mortalidade relacionada ao transplante (MRT), a DECH aguda do TGI continua sendo um obstáculo importante à sobrevivência.^{91,92}

6.1 – O diagnóstico clínico versus o “padrão-ouro” e a busca por outros métodos preditivos ou diagnósticos da DECH aguda

Existem várias outras condições que podem mimetizar ou coexistir com a DECH aguda, como a toxicidade dos regimes de condicionamento que podem causar anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia que também são característicos da DECH, toxicidade por drogas (muito comum em pacientes pós-transplantes em uso de antibioticoterapia de largo espectro, drogas antifúngicas e antivirais, drogas imunossupressoras, hiperalimentação, uso de metotrexato e uso de analgésicos opióides) e infecção entérica por vírus, bactérias e fungos. Os sintomas da colite por CMV, por exemplo, diarreia e dor abdominal, podem ser muito similares aos da DECH aguda.⁹³

O diagnóstico da DECH aguda se baseia inicialmente em critérios clínicos de disfunção da pele, fígado e trato gastrointestinal, sendo esses determinantes para início da terapia imunossupressora adequada.⁹³ Entretanto, a importância da melhoria diagnóstica da DECH se deve pelas seguintes razões:

- Terapêutica imunossupressora grave e prolongada, com seus consequentes efeitos colaterais, principalmente infecções oportunistas graves;
- Presença de infecções de difícil distinção clínica da DECH cujo manejo é dificultado pela imunossupressão e cuja causa é esta mesma condição;
- Necessidade de diagnóstico precoce a fim de reduzir a gravidade das lesões em órgãos alvo e mortalidade relacionada ao transplante através da terapêutica.⁹⁴

Para se obter uma estratégia adequada entre os diversos e contraditórios processos de tratamento, um diagnóstico preciso da DECH aguda é crucial para melhorar os resultados do tratamento e o prognóstico.

Como relatado, o diagnóstico da DECH aguda, usualmente, é baseado em critérios clínicos, mas como a maioria dos sinais e sintomas é inespecífica, a confirmação histológica pode, ou deve ser feita, especialmente, se os sintomas são atípicos, se acometem isoladamente o fígado ou intestino ou se existem outros possíveis diagnósticos diferenciais como reação a drogas ou infecções.⁹³

Na Unidade de Transplantes do Hospital das Clínicas da UFMG, à semelhança do que é revelado na literatura, o diagnóstico da DECH é baseado na presença de sinais e sintomas clínicos, iniciando-se terapia imunossupressora específica e buscando-se, posteriormente, a confirmação histológica. O estadiamento clínico é feito de acordo com os critérios já mencionados, critérios esses validados na literatura.^{55,84}

A incidência da DECH aguda, clinicamente definida, nos pacientes do estudo de 35,5%, está dentro do descrito na literatura,^{14,18,19,56} que varia entre 35% a 70%. Todos os pacientes com diagnóstico clínico foram submetidos à EDA com biópsias de estômago e duodeno buscando uma confirmação histológica, considerada com padrão-ouro.

A questão ética de se realizar endoscopias digestivas altas em pacientes assintomáticos foi uma das dificuldades, das muitas encontradas, do presente estudo. Optou-se pela realização do exame endoscópico apenas em quem apresentava sintomas do TGI, possível mas não necessariamente relacionados à DECH. Outra dificuldade foi o recrutamento dos sujeitos da pesquisa, usualmente sofridos e debilitados por internações e tratamentos quimioterápicos prévios. Os pacientes sentiam-se desconfortáveis com a hipótese de realização de endoscopias digestivas ao lerem o TCLE e muitas vezes, recusaram participar do estudo, mesmo sendo informados de que as endoscopias fazem parte da rotina do Serviço de Transplantes para pacientes sintomáticos.

À exceção do estudo histopatológico de biópsias de pele, fígado ou estômago/intestino dos pacientes com suspeita clínica, não há qualquer outro método diagnóstico validado para a DECH aguda,⁹⁵ assim como não existem métodos diagnósticos ou clínicos⁹⁶ que possam prever quais pacientes são de maior risco para desenvolvimento da DECH aguda, ou até mesmo para prever sobrevida.⁹²

Alguns métodos presentes na literatura, como alguns daqueles utilizados nesse estudo, são métodos caros, trabalhosos e com pouca ajuda tanto para predição quanto para o diagnóstico da DECH.

Paczesny *et al.*⁹⁵ realizaram *microarray* de 120 anticorpos de proteínas em 42 pacientes que foram submetidos a TACTH, tendo revelado oito potenciais biomarcadores para diagnóstico da DECH aguda. Por método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), os níveis desses biomarcadores foram avaliados em amostras de 424 pacientes submetidos à TACTH que foram randomicamente divididos em dois grupos (grupo “treinamento” n=282 e grupo “validação” n=142). A análise de regressão logística desses oito biomarcadores determinou a composição de um painel de quatro proteínas (receptor alfa da interleucina-2, receptor-1 do TNF, interleucina-8 e fator de crescimento do hepatócito) que separava, otimamente, pacientes com e sem DECH aguda, sendo o parâmetro clínico utilizado como diagnóstico. Segundo os autores, esse painel de quatro biomarcadores pode confirmar o diagnóstico de DECH em pacientes com sintomas clínicos e promover informações prognósticas independentemente da gravidade da DECH.

Liu *et al.*⁹⁷ realizaram um estudo prospectivo para investigar a relação entre a diarreia relacionada ao regime de condicionamento (RC), a liberação sistêmica de citocinas

inflamatórias durante o RC, a fase precoce pós-transplante e o desenvolvimento da DECH aguda em 101 pacientes submetidos a TACTH. O estudo confirmou que a correlação entre diarreia e DECH aguda clínica graus II a IV é relacionada ao nível sérico de TNF- α e interleucina-6 durante o RC e durante a fase precoce pós-transplante. Esses achados, segundo os autores, implicam que a simples mensuração do volume de diarreia durante o RC e a fase precoce pós-transplante pode ser um método útil para prever a ocorrência de DECH aguda graus II a IV.

Como nos exemplos citados, a quase totalidade dos estudos de avaliação de métodos prognósticos ou diagnósticos para DECH aguda a fazem comparando com os achados e a classificação clínica. Apesar de a literatura tender a considerar o diagnóstico histológico como o padrão-ouro, na ausência desse método e de outros métodos diagnósticos validados, o diagnóstico clínico ainda é soberano, e pacientes com forte suspeita clínica de DECH aguda, principalmente do TGI, mesmo sem confirmação histológica, serão tratados como tal.^{51,52,93}

6.2 – O diagnóstico endoscópico e a histologia como “padrão-ouro”

Um dos objetivos desse estudo, a tentativa de descrever as alterações encontradas em diversos métodos propedêuticos e, eventualmente, correlacioná-las com a DECH clínica, relacionava-se à busca de métodos que auxiliassem no diagnóstico da DECH aguda de TGI e dispensassem procedimentos endoscópicos em pacientes muito debilitados e com muitas restrições aos mesmos e, na maioria das vezes, plaquetopênicos graves e, portanto, com elevado risco de sangramento à biópsia, principalmente de duodeno.

Qual é o papel da endoscopia digestiva no diagnóstico da DECH aguda do TGI?

O exame endoscópico é um passo importante na busca do diagnóstico definitivo da DECH do TGI, pois ele permite observar a totalidade da mucosa de esôfago, estômago, duodeno e colorretal, permite a obtenção de diagnóstico diferencial (p.ex. presença de monilíase), além de permitir a obtenção de amostras de tecido para avaliação histológica. A controvérsia persiste na capacidade de as alterações endoscópicas predizerem as alterações histológicas ou de terem qualquer impacto na decisão clínica.

No presente estudo, de 21 procedimentos endoscópicos realizados, 10 (47,6%) apresentaram correlação entre o diagnóstico clínico e alterações endoscópicas significativas, entretanto sem significância estatística. Somente um (5,3%) dos 19 procedimentos histológicos realizados apresentou correspondência entre o diagnóstico endoscópico e o diagnóstico histológico. Em quatro pacientes a histologia foi importante para diagnóstico diferencial, principalmente, o de monilíase esofageana e de infecção por CMV.

A correlação entre as alterações endoscópicas e o diagnóstico clínico da DECH, a importância do procedimento endoscópico e a correlação entre endoscopia positiva e histologia positiva para DECH são motivo de grande discussão na literatura.

Ponec *et al.*⁹⁸ descreveram as anormalidades de EDA's em 10 pacientes submetidos a TACTH, com sintomas típicos de DECH do TGI e com confirmação histológica (padrão-ouro), mostrando a grande variabilidade das alterações e destacando os pontos fortes e fracos dos métodos endoscópicos e histológicos: (1) A aparência endoscópica do estômago e duodeno da DECH aguda pode variar de normal a edema ou a eritema leves, até a total destruição da mucosa. Nas fases iniciais, os achados são inespecíficos, mas na DECH grave as alterações endoscópicas são típicas. (2) As alterações de mucosa visíveis macroscopicamente podem ter distribuição desigual, algumas vezes parecendo gravemente acometida em uma área e normal em outra. (3) Amostra de tecido em quantidade adequada é fundamental e deve se estender até a muscular da mucosa para uma visão completa da arquitetura das criptas, o que é dificultado pela situação clínica do paciente e a presença de plaquetopenia. (4) Nem a endoscopia digestiva nem a histologia, avaliadas isoladamente, são confiáveis para o diagnóstico da DECH aguda. (5) Devem ser utilizados outros parâmetros de gravidade, como os dados clínicos, porque apesar da possibilidade de fornecerem o diagnóstico, tanto a endoscopia quanto a histologia são insuficientes para prever a gravidade da DECH (6). Ainda, o diagnóstico histológico pode não se correlacionar com a aparência endoscópica.

Khan *et al.*⁹⁹ estudaram 191 pacientes pediátricos com média de idade de 7,6 anos (DP de 5,6 anos), em um total de 198 procedimentos endoscópicos realizados entre 14 a 1050 dias pós-transplante realizados devido a presença de sintomas clínicos de náuseas, vômitos e/ou diarreia. Alterações endoscópicas visíveis estavam presentes em 63 (32%) das 198 endoscopias e em 40 (64%) das 63 que foram realizadas antes de 100 dias pós-transplante. As anormalidades de mucosa mais comumente descritas foram edema, hiperemia, granulosidade, erosão focal ou nodularidade. A correspondência entre as alterações endoscópicas e a evidência histológica de DECH aguda ocorreu em nove dos 63 (14%) procedimentos.

Cruz-Correa *et al.*¹⁰⁰ de maneira mascarada, compararam 96 imagens endoscópicas da mucosa intestinal de 44 pacientes pós-TACTH, definidas como positivas ou negativas para DECH, com a correspondência dos achados histológicos, que foram considerados como o padrão-ouro. Utilizando 162 pares de endoscopia-histologia, uma associação positiva entre a graduação endoscópica e a graduação histológica da DECH do TGI foi observada e o autor conclui que diagnóstico endoscópico se correlacionou com o diagnóstico histológico, tanto na DECH do TGI aguda quanto na crônica .

Cheung *et al.*¹⁰¹ avaliaram retrospectivamente a correlação entre as alterações endoscópicas e histológicas e o impacto da endoscopia digestiva alta ou baixa no manuseio clínico da DECH de 101 pacientes, utilizando a histologia com padrão-ouro para o diagnóstico. De 42 EDA's, realizadas em pacientes com queixas de dor epigástrica, náuseas e vômitos, 27 foram consideradas positivas, mas somente 14 (33,3%) pacientes apresentaram diagnóstico de DECH à histologia. A sensibilidade global para a presença de DECH foi de 100% mas a especificidade foi de apenas 54%. O valor preditivo positivo foi de 52% e o preditivo negativo de 100%. De um modo geral, a acurácia da EDA para o diagnóstico foi de 69%. De 62

sigmoidoscopias, realizadas em pacientes com diarreia, 51 foram consideradas positivas e 34 (54%) apresentaram comprovação histológica. A sensibilidade foi de 97% e a especificidade de 34%. O valor preditivo positivo foi de 63% e o preditivo negativo de 91%. A acurácia para diagnóstico da DECH da sigmoidoscopia foi de 68%. De 57 pacientes com histologias negativas para DECH, 10 (18%) apresentaram resultados negativos para pesquisa de infecção e foram tratados como DECH, levando-se em consideração apenas o resultado da endoscopia. Os autores concluem que há possibilidade de que a endoscopia tenha um papel crítico na decisão clínica, devendo-se quando possível, buscar a confirmação histológica.

Utilizando essa mesma linha da importância do procedimento endoscópico, Bojarski *et al.*¹⁰² realizaram um estudo piloto utilizando a endomicroscopia confocal (CEM), método não invasivo e que permite a realização de histologia *in vivo*, realizada durante a endoscopia, para diagnóstico da DECH aguda do TGI. Em um total de 35 pacientes, em 14 de 19 pacientes com DECH histologicamente confirmada o diagnóstico pode também ser estabelecido pela CEM, que apresentou uma sensibilidade de 74% e especificidade de 100%. A vantagem do método está na rapidez do diagnóstico e no fato de se evitar transfusões de plaquetas e realização de biópsias.

Os autores, de um modo geral, terminam por concluir que os métodos endoscópicos são considerados métodos complementares ao diagnóstico clínico, mas são necessários para diagnóstico da DECH aguda do TGI em pacientes sintomáticos, e que a histologia deve ser realizada, mesmo em endoscopias com aparência normal, devido a necessidade da menor incerteza possível para iniciar o tratamento da DECH aguda. Complicações resultantes de procedimentos endoscópicos após TACTH estão relacionadas ao risco de bacteremia, de sangramento após biópsias, principalmente do duodeno, e de perfuração intestinal e não devem ser desconsideradas.^{99,103,104}

6.3 – Avaliação do Índice Apoptótico

O diagnóstico histológico da DECH aguda, considerado como o padrão-ouro, é feito se a amostra de biópsia mostra algum grau de apoptose de células epiteliais da cripta, associada à presença de restos cariorréticos, perda de células da cripta, dilatação da mucosa das criptas e das glândulas, abscesso ou obliteração das criptas e presença de infiltrado inflamatório de células predominantemente mononucleares nas criptas e na lâmina própria.^{51,60,61,62,98,99,101} A importância da biópsia tem sido enfatizada na literatura por estudos que mostram que 30% a 80% de pacientes submetidos à TACTH e que persistem com sintomas do TGI, não explicados clinicamente, apresentam DECH histológica, apesar da mucosa normal à endoscopia.^{51,54,98}

A obtenção de biópsias por método endoscópico, entretanto, nem sempre está disponível ou é bem sucedida. Ela, frequentemente, resulta em uma amostra inadequada ou não representativa, sem considerar as complicações já citadas. No presente estudo, dos 21 procedimentos endoscópicos, foi possível a realização de biópsias em 19, mas apenas nove

dessas amostras apresentaram qualidade técnica para realização do índice apoptótico e dos estudos de imunohistoquímica.

Além disso, a limitação mais significativa no diagnóstico histológico recai no fato do patologista basear-se no encontro de apoptose de células epiteliais e não ver as alterações do epitélio como um todo, mesmo quando isto está óbvio para o endoscopista. Numerosas biópsias deveriam ser realizadas para evitar o problema das alterações da mucosa serem focais, o que quase sempre não tem como ser feito devido à presença de plaquetopenia e de outras alterações da coagulação sanguínea. Em termos de poder diagnóstico, a histologia apresenta um bom valor preditivo positivo e boa especificidade à custa de um baixo valor preditivo negativo e de baixa sensibilidade.¹⁰¹

Outros pontos relevantes para o patologista são: (1) o fato das alterações histológicas da DECH, frequentemente, envolverem as porções mais profundas das criptas e, portanto, as biópsias devem se estender até a muscular da mucosa e devem ser seccionadas perpendicularmente à superfície mucosa; (2) a DECH leve pode apresentar somente apoptose esparsa de células epiteliais sem infiltrado inflamatório significativo; (3) nas formas mais graves da DECH do TGI, ocorre desnudamento do epitélio, sendo que a apoptose pode estar ausente.⁹⁸

Qual é a importância da presença de apoptose no diagnóstico da DECH aguda do TGI?

Não encontramos, na literatura pesquisada (MEDLINE, LILACS, SCIELO), nenhum trabalho que avaliou o uso do índice apoptótico, como descrito nesse trabalho, para diagnóstico da DECH aguda de TGI.

Socié *et al.*⁶⁰ utilizou o método de TUNEL⁸⁷ para avaliação de apoptose em microscopia eletrônica e a densidade de células coradas foi graduada como ausente, de 1-5 células, de 5-10 células e >10 células, levando-se em conta a distribuição entre o epitélio e o infiltrado inflamatório, mas sem utilizar o índice descrito nesse trabalho. Nos 95 pacientes, a análise univariada de mortalidade relacionada ao transplante (MRT) no D+90 versus achados histológicos mostrou que mais de 20 neutrófilos por campo, mais de cinco células apoptóticas por campo de infiltrado celular e mais de cinco células marcadas por Fas por campo de infiltrado celular foi significativamente associado ao aumento da mortalidade. Na análise multivariada, mais de cinco células apoptóticas por campo de infiltrado celular e mais de 20 neutrófilos por campo continuaram como fatores de risco independentes. Quando associada a dados clínicos, mais de cinco células apoptóticas por campo de infiltrado celular permaneceu com significância estatística. Na análise multivariada da MRT em um ano, a presença de mais de cinco células apoptóticas por campo de infiltrado celular continuou associada significativamente a um mau prognóstico.

Melhorias na qualidade da enxertia pós-transplante e na profilaxia reduziram de forma significativa a incidência e a gravidade da DECH aguda. Como resultado, os patologistas estão mais propensos a encontrar alterações leves do que quadros avançados e, de fato, uma única

célula apoptótica em uma biópsia pode estar presente. Para determinar os critérios mínimos que devem ser estabelecidos para o diagnóstico da DECH, Nguyen *et al.*¹⁰⁵ avaliaram retrospectivamente 85 biópsias de 47 pacientes submetidos a TACTH. Mais da metade de todas as biópsias (54/85 ou 64%) mostravam apenas células apoptóticas sem outros achados histológicos e, em muitos casos, a gravidade da endoscopia e os achados histológicos não se correlacionaram. No entanto, na opinião dos autores, apesar do diagnóstico poder ser realizado em dados clínicos, a biópsia ainda tem um papel confirmatório, principalmente quando ela é capaz de excluir outras condições que podem mimetizar DECH. O estudo mostrou que amostras com achados leves, contendo uma única célula apoptótica não são raras (11% dos casos) e podem ser um problema diagnóstico para o patologista. Entretanto, os dados sugerem que, no contexto clínico apropriado, até mesmo uma única célula apoptótica no epitélio intestinal deve ser mencionada pelo patologista como possivelmente representativa de DECH, sendo que essa informação pode ser de grande valor para o clínico.

Entretanto, a apoptose é um processo de morte celular morfológica e bioquimicamente distinta no qual a célula se suicida não suscitando resposta inflamatória.

Ao se examinar a literatura sobre apoptose das células digestivas, não relacionada ao TACTH, observa-se que a mucosa do TGI, assim como todos os tecidos compostos por células lábeis ou intermitóticas ativas (epitélios de revestimento, células mieloides e linfoides) é rapidamente renovada no organismo. Assim, apresenta elevadas taxas de mitose e de apoptose como mecanismo de homeostase tissular. Dessa maneira a exposição aos mutagênicos ambientais não se traduz em acúmulo de mutações e a maior predisposição às transformações malignas. No epitélio intestinal a renovação se dá pela descamação das células em apoptose das vilosidades para a luz, que são substituídas constantemente por células geradas nas criptas que migram linearmente da base das criptas em direção à extremidade das vilosidades. A apoptose então representa um importante regulador do número de células e minimiza a susceptibilidade à transformação maligna.^{106,107,108,109,110,111,112}

Na inflamação, a agressão às células induz necrose que resulta na ativação de mediadores bioquímicos e em resposta vascular recrutando leucócitos pela diapedese e quimiotaxia. Quando os leucócitos presentes no foco inflamatório conseguem eliminar o agente agressivo e fagocitar os debrís celulares resultantes da necrose, a diminuição da produção e ativação dos mediadores bioquímicos da inflamação diminuirá o recrutamento de novos leucócitos nos vasos e desencadeará a apoptose nos leucócitos já presentes no foco inflamatório. Dessa maneira, a apoptose é um marcador de resolução do processo inflamatório.^{113,114,115,116,117,118,119}

Portanto, em relação à apoptose deve ser realizada uma distinção entre seu papel como um mecanismo fisiológico na renovação do epitélio (“*turn over*”) do TGI e como um representante de resolução de processos inflamatórios, e seu papel na determinação da gravidade da DECH. Ou seja, segundo a literatura não relacionada ao TACTH, sua função não

seria restrita a uma avaliação da gravidade do processo inflamatório, como presente na tempestade citoquínica e, posteriormente na DECH por exemplo, mas também como marcador de um processo regenerativo positivo para o paciente. Dessa forma seu papel no diagnóstico e prognóstico da DECH deve continuar a ser avaliado.

Nossos resultados sobre o índice apoptótico não permitiram conclusões, em virtude do pequeno tamanho amostral. Observaram-se índices apoptóticos mais elevados, sem significância estatística, nos pacientes que faleceram, nos pacientes que faleceram por DECH, nas formas mais graves de DECH e na presença de DECH. Como os valores de p se encontravam em faixas mais baixas, seria interessante a avaliação da metodologia em estudos com maior poder estatístico.

Incertezas com relação ao diagnóstico histológico da DECH ainda existem e os clínicos devem utilizar todos os dados clínicos, endoscópicos e histomorfológicos para guiar a decisão de tratamento de seus pacientes. Não existe ainda um consenso de qual método constitui o padrão-ouro para diagnóstico da DECH e nem protocolos padronizados a serem seguidos pelos clínicos, endoscopistas ou patologistas.

6.4 – Testes de avaliação da permeabilidade intestinal para diagnóstico da DECH aguda do TGI

O papel da lesão da barreira mucosa (LBM) intestinal no desenvolvimento da DECH tem sido enfatizado na literatura^{66,77,78,81}, que sugere um papel da LBM como gatilho para o surgimento da DECH aguda, tanto pela liberação de citoquinas quanto pela translocação de toxinas bacterianas.^{77,79,80}

Um estudo de 17 pacientes realizado por Johansson *et al.*¹²⁰, nove submetidos à TACTH com regime de condicionamento mieloablativo e oito à regime não-mieloablativo (RIC), a permeabilidade intestinal foi avaliada utilizando o teste de absorção com ⁵¹Cr-EDTA nos dias -1, +4, +7 e + 14 de transplante. Os pacientes que receberam RIC não desenvolveram qualquer alteração na permeabilidade intestinal, estando a mesma significativamente aumentada, em todos os dias avaliados, nos pacientes submetidos a regime mieloablativo. Segundo os autores, a menor toxicidade do TGI, mesmo que subclínica, como demonstrado pelo teste de absorção com ⁵¹Cr-EDTA, está associada ao regime de condicionamento menos intensivo e ao fato dos pacientes continuarem a receber alimentação enteral durante o curso do transplante.

Testes não invasivos como os testes de permeabilidade de açúcares podem detectar alterações na permeabilidade devido à perda de superfície epitelial.¹²¹ No entanto, a restrição com relação ao método é o fato de serem exames caros, dependentes da adesão do paciente e que não conseguem distinguir a lesão mucosa provocada por diferentes regimes

mieloablativos. Uma alternativa aos testes de permeabilidade intestinal é utilizar marcadores bioquímicos de perda da massa de enterócitos do intestino delgado, como no caso da citrulina, sendo que uma diminuição da citrulina circulante corresponde a dano intestinal grave.^{122,123}

Na avaliação da função da barreira intestinal e a presença de DECH, Johansson JE e Ekman T¹²⁴ estudaram a permeabilidade intestinal, utilizando o teste de absorção com ⁵¹Cr-EDTA, em 38 pacientes nos dias -1, +4, +7 e +14 de transplante. Pacientes com DECH leve (graus 0 – I) apresentaram função da barreira intestinal mais preservada ($p=0,04$) e toxicidade intestinal cumulativa menos pronunciada ($p=0,02$) quando comparados com pacientes com quadro de DECH mais grave (graus II – IV). Os dados sugerem que a toxicidade intestinal prediz a gravidade da DECH e, portanto, estratégias de proteção da mucosa do TGI podem diminuir a gravidade da DECH em pacientes submetidos à TACTH.

Uma consideração metodológica em relação às técnicas de avaliação da permeabilidade intestinal é que os fatores pré e pós-mucosa como esfaziamento gástrico, tempo de trânsito intestinal e função renal, podem influenciar os resultados dos testes. Isso levou à formulação do princípio da diferença de excreção de duas substâncias administradas simultaneamente como já descrito. Entretanto, um estudo utilizando o teste de açúcares em pacientes submetidos à TACTH¹²¹ mostrou que dois terços dos pacientes foram incapazes de completar os testes. Outra desvantagem em se utilizar açúcares como marcadores é o fato de estarem sujeitos à degradação bacteriana, o que restringe o tempo de coleta da urina em aproximadamente 5 horas. Quando se utiliza apenas o ⁵¹Cr-EDTA, apesar de ser apenas uma substância, há a possibilidade de se aumentar a sensibilidade do teste prolongando o tempo de coleta da urina.^{120,124}

A realização de testes de permeabilidade intestinal, no presente estudo, poderia ter sido utilizada para prever o surgimento da DECH já que foram feitos exames na fase pré-transplante e no D+14 pós-transplante e, portanto, na avaliação da fase de LBM intestinal. Entretanto, encontramos várias dificuldades na realização destes testes como descrito da literatura. A primeira delas foi com relação à adesão dos pacientes que, apesar de concordarem em participar do estudo, tinham restrições em ingerir a solução de açúcares durante o condicionamento, devido à presença de náuseas e vômitos associados ao tratamento quimioterápico ou radioterápico, e durante a fase de mucosite pós-transplante, devido à presença de náuseas, vômitos, dor abdominal ou diarreia, temendo uma piora do quadro.

A segunda barreira foi a gravidade clínica de alguns pacientes que, mesmo utilizando a presença de sondas naso-gástricas ou naso-entéricas para infusão dos açúcares, encontravam-se com quadro de sepse, insuficiência renal ou respiratória graves que contraindicavam a realização dos exames. Portanto, o número de exames foi reduzindo progressivamente à medida que a fase pós-transplante avançava, o que fez com que o número fosse inadequado e com avaliação estatística não significativa.

Papadopoulou *et al.*¹²⁵ estudando a história natural da lesão do TGI associada ao TCTH, para determinar seu efeito nos índices clínicos e bioquímicos de estado nutricional e de bem-estar, mostrou que pacientes com diarreia apresentavam redução significativa do estado nutricional e do bem-estar em relação aos pacientes sem diarreia e que a enteropatia por perda de proteína que, nesse contexto, sugere a presença de DECH. Um ponto importante é que eles foram incapazes de avaliar a permeabilidade intestinal durante os episódios de diarreia por três motivos principais: a falta de vontade de alguns pacientes em ingerir a solução por estarem sentindo-se mal, vomitar a solução ou a contaminação da urina coletada por diarreia, especialmente em crianças e mulheres. Essa foi também a terceira dificuldade encontrada em nosso trabalho: estudar a permeabilidade intestinal através da excreção de açúcares na urina, em pacientes com diarreia que, muitas vezes, impossibilitou a coleta adequada da amostra.

Existe papel para estudos de avaliação da permeabilidade intestinal no diagnóstico da DECH aguda de TGI?

Em relação ao uso dos testes de permeabilidade intestinal para diagnóstico da DECH, excetuando-se os dois estudos já relatados, o de Mahendra *et al.*,⁸² que é uma relato de caso onde foram utilizados vários métodos e o de Koltun *et al.*⁸³, estudo feito em animais, não existem estudos na literatura que utilizam os testes de permeabilidade intestinal para diagnóstico da DECH e/ou para avaliação de resposta ao tratamento.

Pelas dificuldades técnicas em nosso estudo descritas acima, devido à presença de um número reduzido de pacientes e pela redução progressiva do número de amostras de urina coletadas para realização da R L/M, não foi possível relacionar alterações da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente lesões da barreira intestinal, com o diagnóstico da DECH aguda de TGI.

É possível que exista um papel para os estudos de avaliação da permeabilidade intestinal para o diagnóstico da DECH, mas existe uma limitação em relação ao uso de açúcares como marcadores.

6.5 – Considerações finais

Um consenso quanto ao fato dos dados clínicos, endoscópicos e histológicos serem o padrão ouro para o diagnóstico da DECH do TGI ainda não foi alcançado. Grandes discrepâncias podem ocorrer entre achados grosseiros na endoscopia e os achados histológicos. A endoscopia pode visualizar toda a extensão das alterações enquanto a biópsia está sujeita a variações da amostra e de sua preparação.

Quando uma amostra de biópsia de intestino falha no diagnóstico de DECH a probabilidade do diagnóstico continua alta em pacientes que apresentam sinais e sintomas típicos e endoscopia com alterações grosseiras ou exames radiológicos com evidência de

edema de mucosa, com exames laboratoriais negativos para infecção. Portanto, há consenso de que pacientes com apenas evidência clínica de DECH devam ser tratados.^{51,52}

Por outro lado, um resultado histológico que mostre apenas a presença de apoptose, sem outras alterações histológicas, em paciente sintomático, pode ser considerado como “consistente” para DECH aguda do TGI e o paciente deve ser tratado?

Devido ao fato do diagnóstico da DECH ser uma síntese de achados clínicos, laboratoriais e histopatológicos, é crítico que o patologista trabalhe próximo ao hematologista ou gastroenterologista no cuidado desses pacientes para que se possa estabelecer o diagnóstico de DECH intestinal.

7 – CONCLUSÕES

7.1 – Ocorreram 13 óbitos (41,9%) em 31 casos, no período do estudo, sendo que quatro óbitos (36,4%) ocorreram no Grupo 1 (n=11) , três por DECH aguda grau IV de TGI e um por infecção, esse também com diagnóstico de DECH aguda grave, e nove óbitos (45,0%) no Grupo 2 (n=20), sendo quatro por SOS, quatro por insuficiência respiratória (síndrome de angústia respiratória do adulto - SARA) e um por infecção/sepse.

7.2 – O estudo descritivo das alterações clínicas e dos exames complementares objetivando o auxílio diagnóstico da DECH aguda do TGI, embora sem significância estatística, permite-nos concluir:

a) **Alterações endoscópicas:** dos 15 pacientes submetidos a 21 procedimentos de esofagogastroduodenoscopia até o D+90 pós-transplante, as alterações visíveis foram erosões mucosas, úlceras esofageanas, gastrite enantematosa, hemorragia subepitelial do corpo do estômago, erosões do antro, pangastrite acentuada e duodenite erosiva.

b) O estudo de 19 casos revelou **alterações histológicas** no estômago e duodeno caracterizadas por infiltrado inflamatório leucocitário, necrose do epitélio glandular, aumento da apoptose e presença de corpúsculos apoptóticos, atrofia e ulceração mucosa duodenal, vilosidades achatadas, erosão, atipias regenerativas das criptas e infiltrado inflamatório granulomononuclear.

c) O **índice apoptótico** e os **estudos de imunohistoquímica** mostraram a presença de células inflamatórias em apoptose pela fragmentação do DNA/TUNEL e pela expressão da proteína BAX e, embora não houvesse significância estatística, possivelmente em virtude do pequeno tamanho amostral, observaram-se índices apoptóticos mais elevados nos pacientes que faleceram, nos pacientes que faleceram por DECH, nas formas mais graves de DECH e a presença de DECH clínica.

d) A avaliação da permeabilidade intestinal foi realizada nos três períodos propostos em apenas nove pacientes. Os resultados da R L/M nesses períodos mostram alterações, alguns com alterações pronunciadas, inclusive na fase pré-transplante e, portanto, pré-condicionamento, mas também sem significância estatística. No entanto, a gravidade clínica dos pacientes, com quadros de insuficiência respiratória ou renal, sepse, diarreia e vômitos, caracterizaram dificuldades técnicas importantes, não permitiram correlacionar as alterações da barreira intestinal com o diagnóstico de DECH aguda.

e) A lesão da mucosa do TGI, com quadro clínico de **mucosite**, foi encontrada em 25 (80,6%) dos 31 pacientes estudados, mas não observamos correlação estatística entre a presença de mucosite grave e o desenvolvimento da DECH aguda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Eng J Med* 2006; 354:1813-26.
2. Thomas DE. A History of Bone Marrow Transplantation. *In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum F, eds. Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation.* Boston, MA: Blackwell Scientific, 2004:635-64.
3. Das R, Komorowski R, Hessner MJ, Subramanian H, Huettner CS, Cua D, *et al.* Blockade of interleukin-23 signaling results in targeted protection of the colon and allows for separation of graft-versus-host and graft-versus-leukemia responses. *Blood* 2010; 115:5249-58.
4. Weisdorf D. GVHD - The nuts and bolts. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:62-7.
5. Giralt S. Reduced-intensity conditioning regimens for hematologic malignancies: what have we learned over the last 10 years? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:384-9.
6. Antin JH. Reduced-intensity stem cell transplantation: "...whereof a little more than a little is by much too much." *King Henry IV, part 1, I, 2.* *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:47-54.
7. Tse W, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation: A new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:377-83.
8. Barker JN. Umbilical cord blood (UCB) transplantation: An alternative to the use of unrelated volunteer donors? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:55-61.
9. Spitzer TR. Haploidentical stem cell transplantation: The always present but overlooked donor. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:390-5.
10. Vagliano L, Feraut C, Gobetto G, Trunfio A, Errico A, Campani V, *et al.* Incidence and severity of oral mucositis in patients undergoing haematopoietic SCT-results of a multicentre study. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46:727-32.

*Referências em conformidade com as normas internacionais recomendadas por: ICJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Vancouver: ICMJE, 2001. Disponível em: <http://www.icmje.org>.

11. DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Semin Liver Dis* 2002; 22:27-42.
12. Panoskaltsis-Mortari A, Griese M, Madtes DK, Belperio JA, Haddad IY, Folz RJ, *et al.* An Official American Thoracic Society Research Statement: Noninfectious lung injury after hematopoietic stem cell transplantation: idiopathic pneumonia syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:1262-79.
13. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24:257-72.
14. Sullivan KM. Graft-vs.-Host Disease. *In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum F, eds. Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation.* Boston, MA: Blackwell Scientific, 2004:635-64.
15. Tichelli A, Rovó A, Passweg J, Schwarze CP, Van Lint MT, Arat M, *et al.* Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Late complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2009; 2:583-601.
16. Tichelli A, Rovó A, Gratwohl, A. Late pulmonary, cardiovascular and renal complications after hematopoietic stem cell transplantation and recommended screening practices. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:125-33.
17. Penack O, Holler E, van der Brink MRM. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010; 115:1865-70.
18. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007; 150:197-214.
19. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373:1550-61.
20. Brown GR, Lane GW, Whittington BJ. Disparate role of LIGHT in organ-specific donor T cells activation and effector molecules in MHC class II disparate GVHD. *J Clin Immunol* 2010; 30:178-84.
21. Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, *et al.* Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and

affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematology* 2009; 83:343-56.

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

23. Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of Graft-versus-host disease. *In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum F, eds. Thomas's Hematopoietic Cell Transplantation.* Boston, MA: Blackwell Scientific, 2004:353-68.

24. Jaksch M, Mattsson J. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 2005; 61:398-409.

25. Zeiser R, Reinhard M, Bertz H, Finke J. Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies. *Ann Hematol* 2004; 83:551-65.

26. Mohty M, Gaugler B. Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2008; 19:53-63.

27. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994; 83:2360-7.

28. Hill GR, Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000; 95:2754-9.

29. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001; 293:293-7.

30. Goldberg J, Jacobsolm DA, Zaburak ML, Vogelsang GB. Gastrointestinal toxicity from the preparative regimen is associated with an increased risk of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11:101-7.

31. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90:3204-13.

32. Hill GR, Cooke KR, Brinson YS, Bungard D, Ferrara JLM. Pretransplant chemotherapy reduces inflammatory cytokine production and acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1999; 67:1478-80.
33. Beelen DW, Haralambie E, Brand H, Linzenmeier G, Müller KD, Quabeck K, *et al.* Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992; 80:2668-76.
34. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, *et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92:2303-14.
35. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomized phase II-III trial. *Lancet* 2005; 366:733-41.
36. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, *et al.* A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: Initial treatment. *Blood* 1990; 76:1464-72.
37. Weisdorf D, Haake R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, *et al.* Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: An analysis of clinical risk features and outcome. *Blood* 1990; 75:1024-30.
38. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007; 109:4119-26.
39. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Appelbaum FR, McDonald GB, *et al.* A retrospective analysis of treatment for acute graft-versus-host disease: Secondary treatment. *Blood* 1991; 77:1821-8.
40. Carpenter PA, Sanders JE. Steroid-refractory graft-vs.-host disease: past, present and future. *Pediatr Transplantation* 2003; 7(suppl.3):19-31.
41. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, *et al.* Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:40-6.
42. Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, *et al.* Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2001; 72:1924-9.

43. Furlong T, Storb R, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Doney K, *et al.* Clinical outcome after conversion to FK 506 (tacrolimus) therapy for acute graft-versus-host disease resistant to cyclosporine or for cyclosporine-associated toxicities. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:985-91.
44. Antin JH, Chen AR, Couriel DR, Ho VT, Nash RA, Weisdorf D. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10:655-68.
45. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, *et al.* Mesenchymal stem cell for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81:1390-7.
46. Massenkeil G, Rackwitz S, Genvresse I, Rosen O, Dörken B, Arnold R. Basiliximab is well tolerated and effective in the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30:899-903.
47. Srinivasan R, Chakrabarti S, Walsh T, Igarashi T, Takahashi Y, Kleiner D, *et al.* Improved survival in steroid-refractory acute graft versus host disease after non-myeloablative allogeneic transplantation using a daclizumab-based strategy with comprehensive infection prophylaxis. *Br J Haematol* 2004; 124:777-86.
48. Nogueira MC, Azevedo AM, Pereira SCM, Ferreira JL, Lerner D, Lobo AMG *et al.* Anti-tumor necrosis factor- α for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:1623-9.
49. Levine JE, Paczesny S, Mineishi S, Braun T, Choi SW, Hutchinson RJ, *et al.* Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 111:2470-5.
50. Almaguer DG, Argüelles GJR, Arzaga LDCT, Llano OG, Aguirre HG, Rodríguez OC, *et al.* Alemtuzumab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:10-5.
51. Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Human Pathology* 2009; 40:909-17.
52. Schulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E *et al.* Histopathology diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institute of Health Consensus

Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:31-47.

53. Ross W, Couriel D. Colonic graft-versus-host disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 21:64-9.

54. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, *et al.* Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 1994; 107:1398-1407.

55. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15:825-8.

56. Martin PF, McDonald GB, Sanders FE, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, *et al.* Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10:320-27.

57. Brodoefel H, Bethge W, Vogel M, Fenchel M, Faul C, Wehrmann M, *et al.* Early and late-onset acute GvHD following hematopoietic cell transplantation: CT features of gastrointestinal involvement with clinical and pathological correlation. *Eur J Radiol* 2010; 73:594-600.

58. Yeh SP, Liao YM, Hsu CH, Chen CL, Shen YC, Hsueh CT, *et al.* Gastric bleeding due to graft-vs-host disease: discrepancy between endoscopic and histologic assessment. *Am J Clin Patol* 2004; 122:919-25.

59. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, *et al.* Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:982-9.

60. Socié G, Mary JY, Lemann D, Daneshpouy M, Guardiola P, Meignin V *et al.* Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood* 2004; 103:50-7.

61. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keshavarzian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 2007; 82:881-6.

62. Daneshpouy M, Socié G, Lemann M, Rivet J, Gluckman E, Janin A. Activated eosinophils in upper gastrointestinal tract of patients with graft-versus-host disease. *Blood* 2002; 99:3033-40.

63. Hattori K, Hirano T, Miyajima H, Yamakawa N, Tateno M, Oshimi K, *et al.* Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor α antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 1998; 91:4051-5.
64. DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34:385-96.
65. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Cunha AS. Estudo da permeabilidade intestinal em afecções digestivas. *In: Savassi-Rocha PR, Coelho LGV, Silva RG, Ferrari TCA, eds. Tópicos em Gastroenterologia, 15: Avanços em Gastroenterologia.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006:27-47.
66. Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108:1566-81.
67. Hollander D. The intestinal permeability barrier: a hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27:721-6.
68. Fihn BM, Sjoqvist A, Jodal M. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology* 2000; 119:1029-36.
69. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 1992; 82:471-88.
70. Lifsch CH, Shulm RJ. Intestinal permeability tests: are they clinically useful? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10:283-7.
71. Johnston SD, Smye M, Watson RP. Intestinal permeability tests in coeliac disease. *Clin Lab* 2001; 47:143-50.
72. Perry I, Iqbal T, Cooper B. Intestinal permeability in coeliac disease. *Lancet* 2001; 358:1729-30.
73. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Martins FP, Goulart EMA, Lima AS, Cunha AS. Intestinal permeability and antigliadin antibody test for monitoring adult patients with celiac disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52:1304-9.
74. Meddings J. Barrier dysfunction and Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915:333-8.

75. Vilela EG, Ferrari MLA, Torres HOG, Pinto AG, Aguirre ACC, Martins FP, *et al.* Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43:842-8.
76. Heyman M, Desjeux JF. Cytocine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915:304-11.
77. van der Velden WJFM, Herbers AHE, Feuth T, Schaap NPM, Donnelly JP, Blijlevens NMA. Intestinal damage determines the inflammatory response and early complications in patients receiving conditioning for a stem cell transplantation. *PLoS One* 2010; 5:1-8.
78. Blijlevens NMA, Donnelly JP, Pauw BE. Prospective evaluation of gut mucosal barrier injury following various myeloablative regimens for haematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:707-11.
79. Blijlevens NMA, Donnelly JP, Pauw BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:1269-78.
80. Blijlevens NMA. Implications of treatment-induced mucosal barrier injury. *Curr Opin Oncol* 2005; 17:605-10.
81. Torres HOG, Vilela EG, Cunha AS, Goulart EMA, Souza MHC, Aguirre ACC *et al.* Efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition on short-term survival following allo-SCT: a randomized study. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41:1021-7.
82. Mahendra P, Bedlow AJ, Ager S, Ancliff PJ, Wraight EP, Marcus RE. Technetium (99mTc)-labelled white cell scanning, 51Cr-EDTA and 14C-mannitol-labelled intestinal permeability studies: non-invasive methods of diagnosing acute intestinal graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:835-7.
83. Koltun WA, Bloomer MM, Colony P, Kauffman GL. Increased intestinal permeability in rats with graft versus host disease. *Gut* 1996; 39:291-8.
84. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, *et al.* Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005; 106:1495-500.

85. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(suppl1):31-4.
86. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1161-81.
87. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
88. Marks DI, Wang T, Pérez WS, Antin JH, Copelan E, Gale RP, *et al.* The outcome of full-intensity and reduced-intensity conditioning matched sibling or unrelated donor transplantation in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first and second complete remission. *Blood* 2010;116:366-74.
89. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43:643-53.
90. Oken MM, Creech RH, Torney DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, *et al.* Toxicity and response criteria of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 649-55.
91. McDonald GB. Treatment algorithm for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2010; 32(Suppl A):73-7.
92. Pasquini MC. Impact of graft-versus-host disease on survival. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21:193-204.
93. Jacobson DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 4:35-43.
94. Levine JE, Logan B, Wu J, Alousi AM, Ho V, Bolaños-Meade J, *et al.* Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16: 1693-9.
95. 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.

96. Remberger M, Mattsson J, Hassan Z, Karlsson N, LeBlanc K, Omazic B, *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease grades II-IV after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with unrelated donors: a single centre study. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41:399-405.
97. Liu D, Yan C, Xu L, Wang Y, Han W, Zhang X, *et al.* Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1567-75.
98. Ponec RJ, Hackman RC, McDonald GB. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:612-20.
99. Khan K, Schwarzenberg SJ, Sharp H, Jessurum J, Gulbahce E, DeFor T, *et al.* Diagnostic endoscopy in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Gastrointest Endosc* 2006; 64:379-85.
100. Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, Wu TT, Zahurak M, Vogelsang G, *et al.* Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy* 2002; 34:808-13.
101. Cheung DY, Kim JI, Kim SS, Sung HY, Cho SH, Park SH, *et al.* Endoscopic evaluation in gastrointestinal graft-versus-host disease: comparisons with histological findings. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2947-54.
102. Bojarski C, Günther U, Rieger K, Heller F, Loddenkemper C, Grünbaum M, *et al.* In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy* 2009; 41:433-8.
103. Kaw M, Przepiorka D, Sekas G. Infectious complications of endoscopic procedures in bone marrow transplant recipients. *Dig Dis Sci* 1993; 38:71-4.
104. Zinelis SA, Hershenson LM, Ennis MF, Boller M, Ismail-Beigi F. Intramural duodenal hematoma following upper gastrointestinal endoscopic biopsy. *Dig Dis Sci* 1989; 34:289-91.
105. Nguyen CV, Kastenber DM, Choudhary C, Katz LC, DiMarino A, Palazzo JP. Is single-cell apoptosis sufficient for the diagnosis of graft-versus-host disease in the colon? *Dig Dis Sci* 2008; 53:747-56.

106. Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:179-95.
107. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107:3569-77.
108. Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996; 110:1238-43.
109. Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 1997; 15:82-93.
110. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:821-30.
111. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Gasbarrini G, Corazza GR. Apoptosis and gastrointestinal tract. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31:162-72.
112. Rowe EL, White NA, Buechner-Maxwell V, Robertson JL, Ward DL. Detection of apoptotic cells in intestines from horses with and without gastrointestinal tract disease. *Am J Vet Res* 2003; 64:982-8.
113. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 1997; 61:375-80.
114. Liles W.C. Apoptosis – role in infection and inflammation. *Curr Opin Infect Dis* 1997; 10:165-70.
115. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; 390:350-1.
116. James D. Winkler. Apoptosis in inflammatory cells and diseases. *In: James D. Winkler. Apoptosis in Inflammation. Progress in Inflammation Research.* Birkhauser, 1999.
117. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005; 15:599-607.
118. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:1157-70.

119. Konturek PC, Pierzchalski P, Konturek SJ, Meixner H, Faller G, Kirchner T, Hahn EG. Helicobacter pylori induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. Scand J Gastroenterol 1999; 34:375-83.
120. Johansson JE, Brune M, Ekman T. The gut mucosa barrier is preserved during allogeneic haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. Bone Marrow Transplant 2001; 28:737-42.
121. Fegan C, Poynton CH, Whittaker JA. The gut mucosal barrier in bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1990; 5:373-77.
122. Derikx JPM, Blijlevens NMA, Donnelly JP, Fujii H, Kanda T, van Bijnen AA, *et al.* Loss of enterocyte mass is accompanied by diminished turnover of enterocytes after myeloablative therapy in haematopoietic stem-cell transplant recipients. Ann Oncol 2009; 20:337-42.
123. Herbers AH, Feuth T, Donnelly JP, Blijlevens NM. Citrulline-based assessment score: first choice for measuring and monitoring intestinal failure after high-dose chemotherapy. Ann Oncol 2010; 21:1706-11.
124. Johanson JE, Ekman T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft-versus-host disease severity in patients. Dig Dis Sci 2007; 52:2340-5.
125. Papadopoulou A, Lloyd DR, Williams MD, Darbyshire PJ, Booth IW. Gastrointestinal and nutritional sequelae of bone marrow transplantation. Arch Dis Child 1996; 75:208-13.

Anexo 1:

	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
---	--

Parecer nº. ETIC 092/07

Interessado(a): Prof. Aloísio Sales da Cunha
Depto. Clínica Médica
Fac. Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de maio de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo prospectivo da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) aguda intestinal**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Mariza Santos Castro
Vice -Presidente do COEP-UFMG
Presidente em Exercício

Anexo 2:

Tabela 1
Estadiamento para DECH aguda para cada órgão isolado

Estadio	Pele*	Fígado	Trato gastrointestinal
1	<25% SCT	BbT [±] 2-3 mg/dl	Diarréia 500-1000 ml/dia ou náuseas persistentes [#]
2	25-50% SCT	BbT 3-6 mg/dl	Diarréia 1000-1500 ml/dia
3	Eritrodermia generalizada	BbT 6-15 mg/dl	Diarréia > 1500 ml/dia
4	Descamação ou bolhas	BbT > 15 mg/dl	Dor abdominal grave ou íleo ou sangramento

*SCT=superfície corporal total; [#] Náuseas persistentes requerem confirmação histológica por biópsia do estômago ou duodeno à endoscopia.

DECH=doença do enxerto-contra-hospedeiro; BbT=bilirrubina total.

No estadiamento final consideramos o estadiamento de cada órgão conforma a tabela abaixo:

Tabela 2
Estadiamento clínico final da DECH aguda

Grau	Gravidade	Pele	Fígado	Intestino
0	Nenhuma	0	0	0
I	Leve	1-2	0	0
II	Moderada	3 ou	1 ou	1
III	Grande		2-3 ou	2-3
IV	Risco de morte	4 ou	4 ou	4

DECH: doença do enxerto-contra-hospedeiro

Anexo 3:

Tabela 3
 Marcadores de permeabilidade intestinal, seus pesos moleculares e taxas de permeação intestinal em indivíduos saudáveis, em amostras de urina de cinco horas.

Marcador	Peso Molecular Dáltons	Permeação	
		% excreção da dose oral / 5 horas	
		Isosmolar 200-300 mosmol/Kg	Hiperosmolar 1350-1500 mosmol/Kg
L-arabinose	150	17,5	-
L-ranose	164	10,1	11,7
D-manitol	182	16,8	20,6
Lactulose	342	0,25	0,41
Celobiose	342	-	0,38
⁵¹ Cr-EDTA	359	0,64	0,70
Rafinose	504	0,26	-
PEG 400	194-502	18,2	20,3
^{99m} Tc-DTPA	549	2,8	-
Dextran	3000	0,04	0,12

⁵¹Cr-EDTA=Etilenodiaminotetraacetato marcado com cromo radiotativo; PEG=polietilenoglicol;
^{99m}Tc-DTPA=^{99m}tecnécio-dietilenetriaminopente-acetato.

Anexo 4:**“ESTUDO PROSPECTIVO DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA (DECH) INTESTINAL”****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****PACIENTE MAIOR DE IDADE**

Antes de participar desta pesquisa clínica é importante que você leia e compreenda a explicação sobre todos os procedimentos propostos.

Esta declaração descreve os objetivos da realização desta pesquisa, como ela será realizada, seus benefícios, riscos e precauções. Nenhuma garantia ou promessa poderá ser feita sobre os resultados do estudo.

Pacientes submetidos a transplante de medula óssea podem desenvolver um quadro de “rejeição” associada ao enxerto de células-tronco denominada **doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)** e que pode ser aguda ou crônica. Em sua forma aguda, a DECH pode acometer o estômago e intestino, levando a um quadro de vômitos e/ou diarreia aguda que podem se tornar volumosos e graves, com conseqüente desnutrição e risco aumentado de infecções. O objetivo deste estudo é tentar promover o diagnóstico mais preciso e precoce da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECH) do trato gastrointestinal através de exames específicos conforme explicação abaixo, o que permite o início de tratamento mais rápido, com menores chances de complicação.

O exame de escolha para diagnóstico da DECH gastrointestinal (além da avaliação clínica) é a endoscopia digestiva alta com biópsias do estômago e duodeno sendo esse o exame utilizado hoje como **rotina** para diagnóstico da DECH pela equipe de transplante. O presente estudo está propondo a realização de estudos de permeabilidade intestinal em associação à endoscopia digestiva, objetivando avaliar se os estudos de permeabilidade podem substituir a endoscopia digestiva no diagnóstico da DECH, o que trará grandes benefícios aos pacientes já que os estudos de permeabilidade não são **“invasivos”** como a endoscopia e têm resultados mais rápidos que as biópsias, que demoram em média uma semana para estarem disponíveis.

O estudo de permeabilidade intestinal é uma medida da permeabilidade, isto é, da capacidade de absorção do intestino. Esta medida é realizada através de uma solução de açúcares (lactulose e manitol) ingerida pelo paciente e posteriormente medida na urina. Sempre que for realizado, o paciente recebe uma dose de lactulose e manitol através de uma solução, após um período de jejum de 8 horas. Após a ingestão desta solução o paciente deverá permanecer em jejum por mais 2 horas. Depois disto poderá se alimentar com um lanche e, após o lanche, permanecer em jejum por mais 3 horas. O paciente deverá também colher sua urina durante as 5 horas após ingerir a solução em frascos especiais que lhe serão fornecidos pelos pesquisadores. De um modo geral, o uso da lactulose ou do manitol não acarreta nenhum efeito colateral especial a não ser o incômodo do jejum de 8 horas durante a noite e o de 2 horas durante a manhã, mas raros pacientes podem apresentar diarreia ou desconforto

abdominal após ingestão da solução. Os estudos de permeabilidade intestinal não provocam qualquer tipo de alteração ou interferência com a rotina ou os tratamentos realizados durante o transplante e é o estudo da permeabilidade intestinal em pacientes transplantados o objetivo desse trabalho.

Um protocolo uniforme será seguido por todos pacientes que aceitarem participar da pesquisa, sendo que o estudo será dividido em 2 etapas:

Etapa 1:

- Após a internação do paciente para transplantar, antes de iniciar o *condicionamento*: estudo de permeabilidade intestinal.

Etapa 2:

- Acompanhamento dos pacientes do D+14 até o D+30 pós-transplante:

- Pacientes **sem** sintomas de DECH do trato gastrointestinal: estudo de permeabilidade intestinal no D+14 e no D+30 pós-transplante.

- Pacientes **com** sintomas do trato gastrointestinal – náuseas ou vômitos, falta de apetite acentuada e diarreia: realização de endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsias (exame que é solicitado de rotina pelos médicos do serviço de transplante) + estudo de permeabilidade intestinal. Todos os pacientes com diarreia terão fezes coletas para estudo laboratorial.

- As amostras de “tecido”(biópsias) do estômago e do duodeno, retiradas conforme protocolo e obtidas por endoscopia digestiva alta realizadas no Setor de Endoscopia do HC-UFMG serão enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFMG onde serão processadas e analisadas;

- As amostras de fezes serão colhidas conforme rotina da Unidade de Transplantes e serão enviadas para estudo da possível presença de infecção ao Laboratório Central do HC-UFMG.

Você tem toda a liberdade de decidir se aceita ou não participar deste estudo. Caso concorde poderá abandoná-lo a qualquer momento, sem necessidade de qualquer justificativa. Qualquer que seja a sua decisão você continuará a ter direito ao tratamento, sem restrições. Em caso de dúvida durante a pesquisa você poderá entrar em contato com a Dra. Letícia Rocha Borges na Unidade de Transplantes ou através do telefone (31) 92392571 e com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte ou pelo telefone (31)34094592.

Li e entendi as informações sobre o estudo contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento em participar deste estudo. Recebi uma cópia assinada deste consentimento.

_____ /___/___
Assinatura do paciente

_____ /___/___
Assinatura do pesquisador

**“ESTUDO PROSPECTIVO DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA
(DECH) INTESTINAL”**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PACIENTES MENORES COM IDADE ACIMA DE 14 ANOS**

Antes de participar desta pesquisa clínica é importante que você leia e compreenda a explicação sobre todos os procedimentos propostos.

Esta declaração descreve os objetivos da realização desta pesquisa, como ela será realizada, seus benefícios, riscos e precauções. Nenhuma garantia ou promessa poderá ser feita sobre os resultados do estudo.

Pacientes submetidos a transplante de medula óssea podem desenvolver um quadro de “rejeição” associada ao enxerto de células-tronco denominada **doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)** e que pode ser aguda ou crônica. Em sua forma aguda, a DECH pode acometer o estômago e intestino, levando a um quadro de vômitos e/ou diarreia aguda que podem se tornar volumosos e graves, com conseqüente desnutrição e risco aumentado de infecções. O objetivo deste estudo é tentar promover o diagnóstico mais preciso e precoce da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECH) do trato gastrointestinal através de exames específicos conforme explicação abaixo, o que permite o início de tratamento mais rápido, com menores chances de complicação.

O exame de escolha para diagnóstico da DECH gastrointestinal (além da avaliação clínica) é a endoscopia digestiva alta com biópsias do estômago e duodeno sendo esse o exame utilizado hoje como **rotina** para diagnóstico da DECH pela equipe de transplante. O presente estudo está propondo a realização de estudos de permeabilidade intestinal em associação á endoscopia digestiva, objetivando avaliar se os estudos de permeabilidade podem substituir a endoscopia digestiva no diagnóstico da DECH , o que trará grandes benefícios aos pacientes já que os estudos de permeabilidade não são **“invasivos”** como a endoscopia e têm resultados mais rápidos que as biópsias, que demoram em média uma semana para estarem disponíveis.

O estudo de permeabilidade intestinal é uma medida da permeabilidade, isto é, da capacidade de absorção do intestino. Esta medida é realizada através de uma solução de açúcares (lactulose e manitol) ingerida pelo paciente e posteriormente medida na urina. Sempre que for realizado, o paciente recebe uma dose de lactulose e manitol através de uma solução, após um período de jejum de 8 horas. Após a ingestão desta solução o paciente deverá permanecer em jejum por mais 2 horas. Depois disto poderá se alimentar com um lanche e, após o lanche, permanecer em jejum por mais 3 horas. O paciente deverá também colher sua urina durante as 5 horas após ingerir a solução em frascos especiais que lhe serão fornecidos pelos pesquisadores. De um modo geral, o uso da lactulose ou do manitol não acarreta nenhum efeito colateral especial a não ser o incômodo do jejum de 8 horas durante a noite e o de 2 horas durante a manhã, mas raros pacientes podem apresentar diarreia ou desconforto abdominal após ingestão da solução. Os estudos de permeabilidade intestinal não provocam qualquer tipo de alteração ou interferência com a rotina ou os tratamentos realizados durante o

transplante e é o estudo da permeabilidade intestinal em pacientes transplantados o objetivo desse trabalho.

Um protocolo uniforme será seguido por todos pacientes que aceitarem participar da pesquisa, sendo que o estudo será dividido em 2 etapas.

Etapa 1:

- Após a internação do paciente para transplantar, antes de iniciar o *condicionamento*: estudo de permeabilidade intestinal.

Etapa 2:

- Acompanhamento dos pacientes do D+14 até o D+30 pós-transplante:

- Pacientes **sem** sintomas de DECH do trato gastrointestinal: estudo de permeabilidade intestinal no D+14 e no D+30 pós-transplante.

- Pacientes **com** sintomas do trato gastrointestinal – náuseas ou vômitos, falta de apetite acentuada e diarreia: realização de endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsias (exame que é solicitado de rotina pelos médicos do serviço de transplante) + estudo de permeabilidade intestinal. Todos os pacientes com diarreia terão fezes coletas para estudo laboratorial.

- As amostras de “tecido”(biópsias) do estômago e do duodeno, retiradas conforme protocolo e obtidas por endoscopia digestiva alta realizadas no Setor de Endoscopia do HC-UFGM serão enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFGM onde serão processadas e analisadas;

- As amostras de fezes serão colhidas conforme rotina da Unidade de Transplantes e serão enviadas para estudo da possível presença de infecção ao Laboratório Central do HC-UFGM.

Você tem toda a liberdade de decidir se aceita ou não participar deste estudo. Caso concorde poderá abandoná-lo a qualquer momento, sem necessidade de qualquer justificativa. Está sendo entregue a seus pais ou responsáveis um termo de consentimento semelhante a esse. Para que você possa participar da pesquisa, eles também deverão estar de acordo. Qualquer que seja a sua decisão você continuará a ter direito ao tratamento, sem restrições. Em caso de dúvida durante a pesquisa você poderá entrar em contato com a Dra. Letícia Rocha Borges na Unidade de Transplantes ou através do telefone 92392571 e com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFGM: Av Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte ou pelo telefone (31)34094592.

Li e entendi as informações sobre o estudo contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento em participar deste estudo. Recebi uma cópia assinada deste consentimento.

_____ /___/___
Assinatura do paciente

_____ /___/___
Assinatura do pesquisador

**“ESTUDO PROSPECTIVO DA DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO AGUDA
(DECH) INTESTINAL”**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PACIENTE MENOR DE IDADE

Antes de concordar com a participação de seu(sua) filho(a) ou responsável nesta pesquisa clínica é importante que você leia e compreenda a explicação sobre todos os procedimentos propostos.

Esta declaração descreve os objetivos da realização desta pesquisa, como ela será realizada, seus benefícios, riscos e precauções. Nenhuma garantia ou promessa poderá ser feita sobre os resultados do estudo.

Pacientes submetidos a transplante de medula óssea podem desenvolver um quadro de “rejeição” associada ao enxerto de células-tronco denominada **doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)** e que pode ser aguda ou crônica. Em sua forma aguda, a DECH pode acometer o estômago e intestino, levando a um quadro de vômitos e/ou diarreia aguda que podem se tornar volumosos e graves, com conseqüente desnutrição e risco aumentado de infecções. O objetivo deste estudo é tentar promover o diagnóstico mais preciso e precoce da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECH) do trato gastrointestinal através de exames específicos conforme explicação abaixo, o que permite o início de tratamento mais rápido, com menores chances de complicação.

O exame de escolha para diagnóstico da DECH gastrointestinal (além da avaliação clínica) é a endoscopia digestiva alta com biópsias do estômago e duodeno sendo esse o exame utilizado hoje como **rotina** para diagnóstico da DECH pela equipe de transplante. O presente estudo está propondo a realização de estudos de permeabilidade intestinal em associação á endoscopia digestiva, objetivando avaliar se os estudos de permeabilidade podem substituir a endoscopia digestiva no diagnóstico da DECH , o que trará grandes benefícios aos pacientes já que os estudos de permeabilidade não são **“invasivos”** como a endoscopia e têm resultados mais rápidos que as biópsias, que demoram em média uma semana para estarem disponíveis.

O estudo de permeabilidade intestinal é uma medida da permeabilidade, isto é, da capacidade de absorção do intestino. Esta medida é realizada através de uma solução de açúcares (lactulose e manitol) ingerida pelo paciente e posteriormente medida na urina. Sempre que for realizado, o paciente recebe uma dose de lactulose e manitol através de uma solução, após um período de jejum de 8 horas. Após a ingestão desta solução o paciente deverá permanecer em jejum por mais 2 horas. Depois disto poderá se alimentar com um lanche e, após o lanche, permanecer em jejum por mais 3 horas. O paciente deverá também colher sua urina durante as 5 horas após ingerir a solução em frascos especiais que lhe serão fornecidos pelos pesquisadores. De um modo geral, o uso da lactulose ou do manitol não acarreta nenhum efeito colateral especial a não ser o incômodo do jejum de 8 horas durante a noite e o de 2 horas durante a manhã, mas alguns pacientes podem apresentar diarreia ou desconforto abdominal após ingestão da solução. Os estudos de permeabilidade intestinal não provocam qualquer tipo de alteração ou interferência com a rotina ou os tratamentos realizados durante o

transplante e é o estudo da permeabilidade intestinal em pacientes transplantados o objetivo desse trabalho.

Um protocolo uniforme será seguido por todos pacientes que aceitarem participar da pesquisa, sendo que o estudo será dividido em 2 etapas:

Etapa 1:

- Após a internação do paciente para transplantar, antes de iniciar o *condicionamento*: estudo de permeabilidade intestinal.

Etapa 2:

- Acompanhamento dos pacientes do D+14 até o D+30 pós-transplante:

- Pacientes **sem** sintomas de DECH do trato gastrointestinal: estudo de permeabilidade intestinal no D+14 e no D+30 pós-transplante.

- Pacientes **com** sintomas do trato gastrointestinal – náuseas ou vômitos, falta de apetite acentuada e diarreia: realização de endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsias (exame que é solicitado de rotina pelos médicos do serviço de transplante) + estudo de permeabilidade intestinal. Todos os pacientes com diarreia terão fezes coletas para estudo laboratorial.

- As amostras de “tecido”(biópsias) do estômago e do duodeno, retiradas conforme protocolo e obtidas por endoscopia digestiva alta realizadas no Setor de Endoscopia do HC-UFGM serão enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFGM onde serão processadas e analisadas;

- As amostras de fezes serão colhidas conforme rotina da Unidade de Transplantes e serão enviadas para estudo da possível presença de infecção ao Laboratório Central do HC-UFGM.

Você tem toda a liberdade de decidir se aceita ou não que seu(sua) filho(a) ou responsável participe deste estudo sendo que ele poderá ser abandonado a qualquer momento, sem necessidade de qualquer justificativa. Qualquer que seja a sua decisão, seu(sua) filho(a) ou responsável continuará a ter direito ao tratamento, sem restrições. Em caso de dúvida durante a pesquisa você poderá entrar em contato com a Dra. Letícia Rocha Borges na Unidade de Transplantes ou através do telefone 92392571 e com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFGM: Av Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte ou pelo telefone (31)34094592.

Li e entendi as informações sobre o estudo contidas neste documento. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento de meu(minha) filho(a) ou responsável em participar deste estudo. Recebi uma cópia assinada deste consentimento.

_____ /___/___
Assinatura do pai ou responsável

_____ /___/___
Assinatura do pesquisador

Anexo 5:

Tabela 10
Resultados dos IA dos pacientes do estudo

326*	754	805	911	1988	2084	2341	2346	2570
14,035090	18,656720	5,936073	6,106870	8,021390	6,547619	8,000000	13,043480	14,356440
17,500000	7,874016	11,282050	7,109005	5,660378	5,555555	10,447760	16,428570	7,222222
17,241380	5,820106	8,791209	5,797101	8,148149	8,333333	10,614520	8,593750	6,278027
15,068490	7,006370	7,777778	7,881773	7,222222	8,843537	8,450705	6,410256	9,223301
18,918920	6,967213	8,045977	7,975460	9,302325	7,586207	4,678362	8,088235	14,364640
10,833330	7,476635	8,666667	5,797101	5,940594	9,268292	5,357143	11,111110	11,602210
7,462687	9,743589	9,844560	6,289308	5,084746	9,633027	3,791469	24,509800	6,140351
6,000000	6,842105	11,194030	5,365854	6,134969	5,586592	8,391608	5,084746	5,333333
5,932203	5,303030	6,818182	7,182321	7,092198	9,497207	8,387096	14,912280	5,982906
6,206897	5,976096	8,823529	5,521472	7,906977	16,875000	4,306220	8,396947	6,310679

* Número da lâmina dos pacientes estudados.
IA=índice apoptótico.

Tabela 11

Resultados da análise estatística do IA dos pacientes do estudo

	326*	754	805	911	1988	2084	2341	2346	2570
Number of values	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Minimum	5,932	5,303	5,936	5,366	5,085	5,556	3,791	5,085	5,333
25% Percentile	6,155	5,937	7,538	5,728	5,871	6,307	4,585	7,669	6,101
Median	12,43	6,987	8,729	6,198	7,157	8,588	8,194	9,852	6,766
75% Percentile	17,31	8,341	10,18	7,357	8,053	9,531	8,950	15,29	12,29
Maximum	18,92	18,66	11,28	7,975	9,302	16,88	10,61	24,51	14,36
Mean	11,92	8,167	8,718	6,503	7,051	8,773	7,242	11,66	8,681
Std. Deviation	5,243	3,889	1,722	0,9634	1,327	3,235	2,516	5,814	3,525
Std. Error	1,658	1,230	0,5444	0,3047	0,4197	1,023	0,7956	1,839	1,115
Lower 95% CI of mean	8,169	5,384	7,486	5,813	6,102	6,458	5,443	7,499	6,160
Upper 95% CI of mean	15,67	10,95	9,950	7,192	8,001	11,09	9,042	15,82	11,20

* Número da lâmina dos pacientes estudados.
IA=índice apoptótico.

Anexo 6:

Controles sadios do estudo de permeabilidade intestinal – R L/M (relação lactulose/manitol):

1. 0,002
2. 0,002
3. 0,002
4. 0,002
5. 0,002
6. 0,002
7. 0,003
8. 0,003 mediana
9. 0,003
10. 0,004
11. 0,004
12. 0,006
13. 0,008
14. 0,009
15. 0,011
16. 0,013

0,00475 média
0,003587 desvio padrão
0,011924 média + 2 desvios padrão

Anexo 7:

BANCO DE DADOS DOS PACIENTES DO ESTUDO

ID	REGISTRO	DN	IDADE	SEXO	D.INTERN.	DIAGNOSTICO	HLA	GS	RH	CMV IGG	DATA TMO	TIPO TMO	CONDICIONAMENTO	PROFILAXIA	FC
1	859158	07/03/1973	34	F	06/08/2007	MALIGNA AR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	14/08/2007	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA MMF	CTP
2	345135	01/01/1954	53	F	17/08/2007	MALIGNA BR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	28/08/2007	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	CTP
3	867257	03/08/1965	42	M	27/08/2007	NÃO MALIGNA	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	18/09/2007	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO
4	867378	07/08/1985	22	F	15/09/2007	NÃO MALIGNA	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	27/09/2007	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO
5	851223	23/03/1954	53	M	30/10/2007	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	08/11/2007	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	MO
6	739678	22/07/1984	23	F	24/11/2007	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	04/12/2007	NÃO APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	MO
7	864944	15/12/1969	37	F	23/11/2007	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	06/12/2007	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
8	877633	08/09/1987	20	M	07/02/2008	NÃO MALIGNA	IDENTICO	A	NEGATIVO	POSITIVO	19/02/2008	NÃO APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	MO
9	867390	07/02/1985	23	M	27/03/2008	MALIGNA AR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	08/04/2008	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
10	783484	10/05/1978	30	M	09/05/2008	NÃO MALIGNA	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	20/05/2008	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO
11	873350	10/01/1994	14	M	13/05/2008	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	28/05/2008	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	MO
12	880325	20/08/1987	21	F	29/01/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	16/02/2009	NÃO APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	CORDAO
13	912243	04/03/1988	20	M	19/02/2009	NÃO MALIGNA	IDENTICO	A	POSITIVO	NEGATIVO	11/03/2009	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO
14	915786	15/05/1950	58	M	26/03/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	02/04/2009	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA MMF	CTP
15	801090	14/03/1987	22	F	12/03/2009	NÃO MALIGNA	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	07/04/2009	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
16	906925	13/11/1978	30	M	06/04/2009	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	15/04/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
17	858117	26/09/1967	41	F	20/04/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	O	NEGATIVO	POSITIVO	06/05/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
18	919358	28/01/1994	15	M	27/05/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	24/06/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
19	917684	31/10/1990	18	M	15/07/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	O	NEGATIVO	POSITIVO	30/07/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CORDAO
20	919816	19/04/1986	23	M	22/08/2009	NÃO MALIGNA	IDENTICO	B	POSITIVO	POSITIVO	03/09/2009	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
21	912477	25/02/1977	32	F	28/08/2009	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	15/09/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
22	928797	22/06/1966	43	M	20/10/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	30/10/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
23	932149	27/01/1958	51	F	16/10/2009	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	04/11/2009	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	CTP
24	928465	20/07/1994	15	F	10/12/2009	MALIGNA AR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	04/01/2010	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
25	923488	04/09/1973	36	F	29/12/2009	MALIGNA BR	IDENTICO	A	POSITIVO	POSITIVO	20/01/2010	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	CTP
26	938131	10/10/1959	50	F	11/01/2010	MALIGNA BR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	27/01/2010	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA	CTP
27	933456	09/09/1970	39	F	25/01/2010	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	05/02/2010	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
28	934511	12/12/1987	22	M	30/03/2010	MALIGNA AR	IDENTICO	O	POSITIVO	POSITIVO	08/04/2010	APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
29	693206	28/09/1987	22	M	24/04/2010	MALIGNA AR	IDENTICO	A	NEGATIVO	POSITIVO	06/05/2010	NÃO APARENTADO	MIELOABLATIVO	CSA MTX	CTP
30	949329	02/03/1989	21	F	14/05/2010	NÃO MALIGNA	IDENTICO	A	POSITIVO	NEGATIVO	09/06/2010	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO
31	875193	19/10/1965	42	F	04/03/2008	NÃO MALIGNA	IDENTICO				25/03/2008	APARENTADO	NÃO MIELOABLATIVO	CSA	MO

MUCOSITE	GRAU	MORFINA	NE	NPT	SOS	IRA	INFECÇÃO	AG CMV	CMV D	PEGA	D NEUTR	D PLAQ	GVHD AG	ESTADIO CLINICO	GVHD TGI	GRAU	GVHD PELE	GRAU
NAO		NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM	03/09/2007	24/08/2007	SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIV	NAO	
NAO		NAO	SIM	NAO	NAO	SIM	INF CATETER	POSITIVA	NAO	SIM	11/09/2007		SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIV	SIM	GRAUIII
SIM	GRAVE	SIM	SIM	NAO	NAO	SIM	INF FUNGICA	POSITIVA	NAO	SIM	07/10/2007		SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUII	NAO	
SIM	LEVE/MOD	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	INF FUNGICA	POSITIVA	NAO	SIM	18/10/2007	22/10/2007	SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUII	NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	NAO	NAO	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	04/12/2007	02/12/2007	NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	NAO	SIM	SIM	NAO	NAO	SEPSE	POSITIVA	NAO	SIM	27/12/2007	27/12/2007	NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	NAO	SIM	INF FUNGICA	POSITIVA	NAO	SIM	17/12/2007		SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIV	NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	NAO	SIM	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	NAO	SIM	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM	05/06/2008	05/06/2008	NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	INF CATETER	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SEPSE	NEGATIVA	NAO	NAO			SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIV	SIM	GRAUIV
SIM	LEVE/MOD	SIM	NAO	NAO	NAO	NAO	SEPSE	NEGATIVA	NAO	SIM	10/04/2009	05/04/2009	NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	SIM	NAO	NAO	SIM	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	15/04/2009	14/04/2009	SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIII	SIM	GRAUI
SIM	LEVE/MOD	NAO	NAO	NAO	NAO	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	01/05/2009		NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	05/05/2009	05/05/2009	SIM	MODERADO GRAUII	SIM	GRAUI	SIM	GRAUI
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SEPSE	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	SIM	NAO	NAO	SIM	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM	18/07/2009		NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SEPSE	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	NAO	NAO	NAO	NAO	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	19/09/2009	09/10/2009	NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	SIM	NAO	NAO	NAO	SIM	NEUTROPENIA FEBRIL	POSITIVA	NAO	SIM	04/10/2009	06/10/2009	NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	INF FUNGICA	NEGATIVA	NAO	SIM	12/11/2009		SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIII	SIM	GRAUI
NAO		SIM	NAO	NAO	SIM	NAO	INF CATETER	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SEPSE	POSITIVA	SIM	SIM	23/01/2010		SIM	GRAVE GRAUIII/IV	SIM	GRAUIII	NAO	
NAO		SIM	NAO	NAO	NAO	NAO	INF FUNGICA	POSITIVA	NAO	SIM	05/02/2010		NAO		NAO		NAO	
NAO		NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM			NAO		NAO		NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	NAO	SIM	INF CATETER	POSITIVA	NAO	SIM	25/02/2010	05/03/2010	SIM	MODERADO GRAUII	SIM	GRAUI	NAO	
SIM	GRAVE	SIM	SIM	SIM	NAO	SIM	SEPSE	NEGATIVA	NAO	NAO			NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM	23/05/2010	20/05/2010	NAO		NAO		NAO	
SIM	LEVE/MOD	NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	NEUTROPENIA FEBRIL	NEGATIVA	NAO	SIM	05/07/2010	10/07/2010	NAO		NAO		NAO	
NAO		NAO	NAO	NAO	NAO	NAO	SEPSE	POSITIVA	NAO	SIM	08/04/2008	07/04/2008	NAO		NAO		NAO	

GVHD FIG	GRAU	EPF	TOXINA A	EDA 1	D EDA1	DIAG EDA	DIAG AP1	EDA 2	D EDA2	DIAG EDA2	DIAG AP2	IMUNO	IA MEDIA	IA MEDIANA	PI 1	DATA PI 1	DIA PI 1	MANIT 1	LACTU 1	L/M 1
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	28/09/2007	LEVES	GVHD	NÃO				SIM	8.588	8.773	SIM	10/08/2007	-4	7.70	0.064	0.00830
SIM	GRAUIII	NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	19/10/2007	MODERADOS	NORMAL	NÃO				NAO			SIM	20/08/2007	-8	2.30	0.110	0.04780
NAO		POSITIVO	NEGATIVO	SIM	31/10/2007	MODERADOS	DISCRETAS	NÃO				SIM	9.852	11.660	SIM	03/09/2007	-15	19.00	0.630	0.03300
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	01/11/2007	LEVES	GVHD	NÃO				SIM	8.194	7.242	SIM	19/09/2007	-8	10.00	0.010	0.00100
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	06/12/2007	LEVES	DISCRETAS	SIM	28/01/2008	LEVE	DISCRETAS	SIM	6.766	8.681	NÃO					
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	07/01/2008	SANGRAM		NÃO							SIM	26/11/2007	-8	14.70	0.088	0.00590
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	28/12/2007	LEVES	CMV	SIM	08/02/2008	MODERADAS	DISCRETAS				SIM	28/11/2007	-8	13.00	0.140	0.01070
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO				NAO			SIM	12/02/2008	-7	1.16	0.012	0.01030
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO				NAO			SIM	02/04/2008	-7	15.75	0.014	0.00088
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO				NAO			NÃO					
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO				NAO			SIM	21/05/2008	-6	5.60	0.013	0.00230
SIM	GRAUIV	NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	12/03/2009	ULCERA ESOF	ESOFAGO	SIM	17/03/2009	LEVES	NORMAL	SIM	12.430	11.920	SIM	04/12/2009	-12	11.20	0.140	0.01250
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO							SIM	05/03/2009	-8	14.40	0.010	0.00069
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	15/04/2009	LEVES	GVHD	NAO	05/05/2009	MODERADAS	CMV	SIM	6.987	8.167	SIM	03/04/2009	1	2.90	0.000	0.00000
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	NAO				NAO				NAO			SIM	25/03/2009	-13	20.40	0.087	0.00420
NAO		NEGATIVO	NEGATIVO	SIM	11/05/2009	ACENTUADAS	CMV	NAO				SIM	8.729	8.718	SIM	10/04/2009	-5	16.50	0.010	<0.00060
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	06/05/2009	0	11.00	0.016	
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	17/06/2009	-7	19.00	0.010	<0.00052
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	25/07/2009	-5	12.75	0.043	0.00330
NAO		NEGATIVO	0	SIM	06/10/2009	LEVES	NORMAL	NAO				SIM	7.157	7.051	SIM	28/08/2009	-6	3.30	0.000	0.00000
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			NÃO	02/09/2009	-13	6.75	0.010	<0.00140
SIM	GRAUI	NEGATIVO	0	SIM	16/11/2009	LEVES	DISCRETAS	NAO							SIM	23/10/2009	-7	12.50	0.010	<0.00800
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	27/10/2009	-8	19.60		
SIM	GRAUIII	NEGATIVO	0	SIM	01/02/2010	ACENTUADAS	DISCRETAS	NAO							SIM	21/12/2009	-14	5.85	0.160	0.02730
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	07/01/2010	-13	6.90	0.080	0.01150
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	17/01/2010	-10	9.60	0.064	0.00660
NAO		NEGATIVO	0	SIM	02/03/2010	LEVES	NORMAL	NAO				NAO			SIM	30/01/2010	-6	13.30	0.150	0.01120
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	01/04/2010	-7	22.00	0.090	0.00400
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	05/05/2010	-1	4.60	0.010	0.00210
NAO		NEGATIVO	0	NAO				NAO				NAO			SIM	01/06/2010	-8	12.80	0.260	0.02000
NAO		NEGATIVO	0	SIM	08/05/2008	LEVES	DISCRETAS	NAO				SIM	6.198	6.503	NÃO					

PI 2	DATA PI 2	DIA PI 2	MANIT 2	LACTU 2	L/M 2	PI 3	DATA PI 3	DIA PI 3	MANIT 3	LACTU 3	L/M 3	PI 4	ALTA	ÓBITO	DATA OBITO	CAUSA	DIA TMO
SIM	28/08/2007	14	6.00	0.270	0.04500	NÃO						NÃO	11/09/2007	SIM	20/10/2007	GVHD	66
SIM	11/09/2007	14	1.23	0.067	0.05440	SIM	02/10/2007	35	3.60	1.250	0.34700	NÃO	25/10/2007	SIM	25/10/2007	GVHD	57
SIM	02/10/2007	14	5.90	0.028	0.00470	SIM	23/10/2007	35	3.50	0.010	0.00280	SIM	07/12/2007	NÃO			80
SIM	11/10/2007	14	15.60	0.011	0.00070	SIM	29/10/2007	32	12.60	0.064	0.00500	NÃO	13/11/2007	NÃO			47
SIM	26/11/2007	18	6.30	0.270	0.04300	SIM	05/12/2007	27	7.70	0.190	0.02500	NÃO	18/12/2007	NÃO			40
SIM	18/12/2007	14	4.90	0.010	0.00200	NÃO						NÃO	21/01/2008	SIM	21/01/2008	TRM	48
NÃO						NÃO						SIM	09/04/2008	SIM	23/11/2008	GVHD	11 M
SIM	05/03/2008	14	1.75	0.290	0.16500	NÃO						NÃO	09/03/2008	SIM	09/03/2008	TRM	19
NÃO						NÃO						NÃO	25/04/2008	SIM	25/04/2008	TRM	17
SIM	05/06/2008	17	3.40	0.280	0.08230	NÃO						NÃO	13/06/2008	SIM	26/07/2009	RECIDIVA	1 A E 1M
NÃO						NÃO						NÃO	04/07/2008	SIM	04/07/2008	TRM	37
SIM	05/03/2009	17	1.67	0.064	0.03830	NÃO						NÃO	31/03/2009	SIM	31/03/2009	GVHD	43
SIM	25/03/2009	14	10.80	0.060	0.00550	SIM	10/04/2009	30	2.50	0.000	0.00000	NÃO	11/04/2009	NÃO			31
SIM	17/04/2009	15	0.43	0.011	0.02550	SIM	06/05/2009	34	0.53	0.000	0.00000	NÃO	25/04/2009	NÃO			23
SIM	21/04/2009	14	5.60	0.000	0.00000	SIM	08/05/2009	31	6.66	0.000	0.00000	NÃO	22/04/2009	NÃO			44
SIM	29/04/2009	14	5.40	1.540	0.28500	SIM	13/05/2009	28	2.60	2.970	114.200	SIM	27/05/2009	SIM	26/08/2009	TRM	132
NÃO						NÃO						NÃO	20/05/2009	SIM	20/05/2009	TRM	14
SIM	09/07/2009	15	7.25	0.010	<0.00130	SIM	25/07/2009	31	11.10	0.060	0.00540	NÃO	17/08/2009	NÃO			54
NÃO						NÃO						NÃO	19/08/2009	SIM	19/08/2009	TRM	20
SIM	16/09/2009	13	10.15	0.000	0.00000	SIM	03/10/2009	30	4.40	0.010	<0.00220	NÃO	03/11/2009	SIM	07/04/2010	TRM	6 M
SIM	29/09/2009	14	6.00	0.076	0.01260	NÃO						NÃO	08/10/2009	NÃO			21
SIM	18/11/2009	19	2.80	0.130	0.04640	SIM	28/11/2009	29	18.60	0.200	0.01070	NÃO	02/12/2009	NÃO			33
NÃO						NÃO						NÃO	12/11/2009	SIM	12/11/2009	TRM	8
SIM	25/01/2010	21	2.00	0.000	0.00000	NÃO						NÃO	09/03/2010	SIM	09/03/2010	TRM	62
SIM	05/02/2010	16	0.35	0.000	0.00000	SIM	19/02/2010	30	5.50	0.000	0.00000	NÃO	17/03/2010	SIM	17/03/2010	TRM	56
SIM	09/02/2010	13	10.70	0.010	<0.00090	SIM	24/02/2010	28	10.70	0.300	0.02800	NÃO	24/02/2010	NÃO			29
NÃO						SIM	05/03/2010	28	0.60	0.000	0.00000	NÃO	24/03/2010	SIM	10/06/2010	RECIDIVA	4 M
SIM	23/04/2010	15	1.10	0.250	0.22700	NÃO						NÃO	02/05/2010	SIM	02/05/2010	TRM	24
SIM	19/05/2010	13	2.30	0.044	0.01900	NÃO						NÃO	26/05/2010	SIM	13/09/2010	TRM	127
SIM	24/06/2010	15	6.70	0.023	0.00340	SIM	11/07/2010	32	10.00	0.010	<0.00100	NÃO	14/07/2010	NÃO			36
NÃO						NÃO						NÃO	18/04/2008	NÃO			24

ANEXO 8:

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO


**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

 Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
 Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
 Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640


ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LETÍCIA ROCHA BORGES, nº de registro 2009659010. Às quatorze horas do dia vinte e nove de setembro de 2011, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA DO TRATO GASTROINTESTINAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS. ESTUDO DESCRITIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DOS EXAMES COMPLEMENTARES", requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Aloisio Sales da Cunha, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Aloisio Sales da Cunha/ Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Henrique Oswaldo da Gama Torres/ Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Afonso Celso Vigorito	Instituição: UNICAMP	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Wellington Morais Azevedo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de setembro de 2011.

Prof. Aloisio Sales da Cunha/ Orientador _____

Prof. Henrique Oswaldo da Gama Torres/ Coorientador _____

Prof. Afonso Celso Vigorito _____

Prof. Wellington Morais Azevedo _____

Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Coord. PG. em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto
Faculdade de Medicina / UFMG

ANEXO 9:**DECLARAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640

**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Aloísio Sales da Cunha, Henrique Oswaldo da Gama Torres, Afonso Celso Vigorito e Wellington Moraes Azevedo, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DO ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO AGUDA DO TRATO GASTROINTESTINAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS. ESTUDO DESCRITIVO DAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DOS EXAMES COMPLEMENTARES”**, apresentada pela mestrandia **LETÍCIA ROCHA BORGES**, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de setembro de 2011.

Prof. Aloísio Sales da Cunha
Orientador

Prof. Henrique Oswaldo da Gama Torres
Coorientador

Prof. Afonso Celso Vigorito

Prof. Wellington Moraes Azevedo