

LEANDRO NAPIER DE SOUZA

**MICROQUIMERISMO EM GLÂNDULAS
SALIVARES LABIAIS DE PACIENTES
SUBMETIDAS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Belo Horizonte/MG

Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais

2010

LEANDRO NAPIER DE SOUZA

**MICROQUIMERISMO EM GLÂNDULAS
SALIVARES LABIAIS DE PACIENTES
SUBMETIDAS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS
TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Área de concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Co-orientadora: Dra. Daniela Rodrigues Faria

Belo Horizonte/MG

Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Minas Gerais

2010

S729m Souza, Leandro Napier de
2010 Microquimerismo em glândulas salivares labiais de pacientes submetidas
T a transplante de células tronco hematopoiéticas / Leandro Napier de Souza.
2010.
80 f.: il.
Orientador: Ricardo Santiago Gomez
Co-orientadora: Daniela Rodrigues Faria
Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Odontologia.
1. Quimerismo – Teses. 2. Glândulas salivares menores – Teses.
3. Transplante de células-tronco hematopoéticas – Teses. I. Gomez, Ricardo
Santiago. II. Faria, Daniela Rodrigues. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047

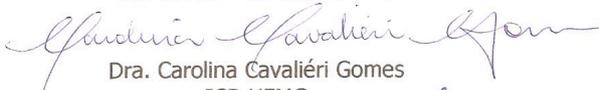


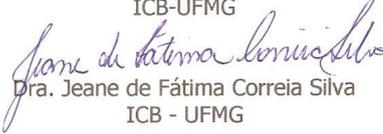
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "*Microquimerismo em glândulas salivares labiais de pacientes submetidas a transplante de células tronco hematopoiéticas*", área de concentração em **Estomatologia**, apresentada por **Leandro Napier de Souza**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

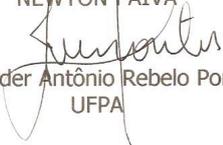

Dr. Ricardo Santiago Gomez
FO-UFMG - Orientador


Dra. Daniela Rodrigues Faria
ICB-UFMG - Co-Orientadora


Dra. Carolina Cavaliéri Gomes
ICB-UFMG


Dra. Jeane de Fátima Correia Silva
ICB - UFMG


Dra. Júnia Noronha Carvalhais Amorim
NEWTON PAIVA


Dr. Helder Antônio Rebelo Pontes
UFPA


Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Subcoordenadora do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 29 de julho de 2010.

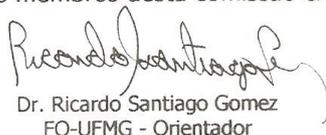


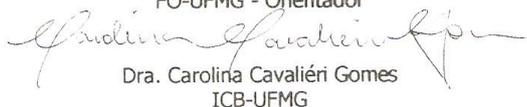
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br



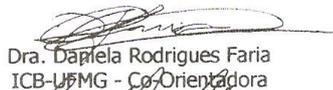
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em **Estomatologia**, do candidato **Leandro Napier de Souza**

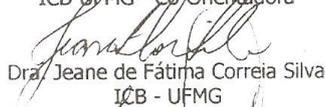
Aos 29 de julho de 2010, às 08:30 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr., Dra. Daniela Rodrigues Faria, Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, Dra. Jeane de Fátima Correia Silva, Dra. Júnia Noronha Carvalhais Amorim e Dr. Helder Antônio Rebelo Pontes. O Professor Dr. Ricardo Santiago Gomez, Orientador da Tese, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. Ao candidato foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Microquimerismo em glândulas salivares labiais de pacientes submetidas a transplante de células tronco hematopoiéticas**". Encerrada a exposição, foi iniciada a arguição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dr. Helder Antônio Rebelo Pontes, Dra. Júnia Noronha Carvalhais Amorim, Dra. Jeane de Fátima Correia Silva, Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, Dra. Daniela Rodrigues Faria e Ricardo Santiago Gomez, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as arguições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado ao candidato. A Comissão Examinadora opta pela aprovação..... do candidato. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dr. Ricardo Santiago Gomez, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 29 de julho de 2010.

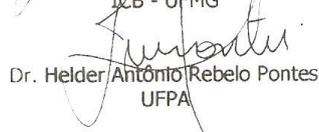

Dr. Ricardo Santiago Gomez
FO-UFMG - Orientador


Dra. Carolina Cavaliéri Gomes
ICB-UFMG


Dra. Júnia Noronha Carvalhais Amorim
NEWTON PAIVA


Dra. Daniela Rodrigues Faria
ICB-UFMG - Co-Orientadora


Dra. Jeane de Fátima Correia Silva
ICB - UFMG


Dr. Helder Antônio Rebelo Pontes
UFPA

DEDICATÓRIA

A Deus;

À Ana Cristina, minha fiel
companheira de todas as horas, pelo
amor, incentivo, paciência,
compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, pela disponibilidade de orientar este trabalho, pela sua inestimável contribuição na formação de professores e pesquisadores, incluindo a minha.

À Dra. Daniela Rodrigues Faria, co-orientadora deste trabalho, que foi fundamental em todas as etapas, estando sempre disponível para realização dos experimentos, ausentando-se do convívio familiar, algumas vezes em dias e horários fora do comum. Agradecimentos estendidos à Isabela e ao Júnior.

À Profa. Walderez Ornelas Dutra, pelo apoio e disponibilidade de participação na realização deste trabalho.

Aos Professores Vagner e Tarcília, pelo apoio e disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

Aos Professores Ricardo Alves de Mesquita e Diele Carine Barreto Arantes pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Aos colegas do Laboratório das Interações Celulares do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Aos funcionários da equipe de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UFMG.

Aos colegas do Mestrado e Doutorado em Odontologia da UFMG.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Aos pacientes, pela disposição e confiança em nosso trabalho.

À minha esposa, Ana Cristina Rodrigues Antunes de Souza, pelo amor dedicado, pelo companheirismo e cumplicidade em tudo, inclusive na realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Suba o Primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

SSC	- Solução de Citrato de Sódio Salino
AA	- Anemia Aplásica
cGVHD	- do inglês: Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
COEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CsA	- Ciclosporina A
CTP	- Células tronco periféricas
DAPI	- 4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride
DECH	- Doença do enxerto contra o hospedeiro
DECHa	- Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda
DECHc	- Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
FISH	- Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FO-UFMG	- Faculdade de Odontologia da UFMG
GSL	- Glândulas salivares labiais
HC-UFMG	- Hospital das Clínicas da UFMG
HE	- Hematoxilina e eosina
HLA	- Antígeno leucocitário humano
ICT	- Irradiação corpórea total
LPB –FOUFMG	- Laboratório de patologia bucal da FO-UFMG
LMA	- Leucemia mielóide aguda
LMC	- Leucemia mielóide crônica
MC	- Microquimerismo
MHC	- do inglês: antígenos principais de histocompatibilidade
MTX	- Metotrexato
MO	- Medula óssea
NIH	- Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América
PAS	- Ácido periódico de Schiff

PBS	- Solução tampão fosfato
PCR	- do inglês: reação em cadeia de polimerase
Projeto TMO-FOUFMG	- Projeto de transplante de medula óssea da FOUFMG
SCU	- Sangue de cordão umbilical
TCTH	- Transplante de células tronco hematopoiéticas.
TMO	- Transplante de medula óssea
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais

ÍNDICE

Abreviaturas, símbolos e siglas.....	v
Índice.....	vii
Índice de ilustrações.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	13
2. Revisão de literatura.....	15
2.1 Transplante de medula óssea (TMO)/ Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH).....	15
2.2 Transplante de células tronco hematopoiéticas e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).....	19
2.3 Microquimerismo.....	35
2.3.1 Microquimerismo e doença do enxerto contra o hospedeiro.....	40
3. Objetivo.....	43
4. Metodologia.....	44
4.1 Seleção das amostras.....	44
4.2 Coleta do material e obtenção dos cortes.....	45
4.3 Coloração histológica.....	46
4.4 Teste de hibridização “in situ” por fluorescência (FISH).....	47
4.5 Reações de imunofluorescência.....	48
4.6 Microscopia confocal.....	50
4.7 Análise das imagens.....	50
4.8 Coletas de dados dos pacientes.....	51

5. Resultados.....	53
6. Discussão.....	58
7. Conclusões.....	60
8. Referências Bibliográficas.....	61
Anexos.....	79

Índice de Ilustrações

QUADRO 1– Características clínicas da DECHc segundo Schubert <i>et al.</i> (1984) _____	22
QUADRO 2- Características histológicas da DECHc segundo Schubert <i>et al</i> (1984) ____	23
QUADRO 3- Classificação DECHc proposta por Horn (1995) _____	29
QUADRO 4- Pacientes do gênero feminino estudadas, doença primária, tipo de TMO, estágio de DECHc, gênero do doador e idade do paciente _____	52
QUADRO 5- Pacientes estudados, marcação para microquimerismo do cromossomo Y e para citoqueratina AE1/AE3, classificação da DECHc e gênero do doador _____	53
FIGURA 1- Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência do controle positivo evidenciando positividade de marcação para cromossomo Y _____	54
FIGURA 2- Série Z da amostra anterior, evidenciando localização nuclear ou perinuclear do cromossomo Y _____	54
FIGURA 3- Imunofluorescência para Citoqueratina AE1/AE3 para evidenciar a natureza epitelial das células da amostra anterior _____	55
FIGURA 4- Controle masculino sem sonda com grande aumento de captação do sinal sem marcação positiva _____	55
FIGURA 5- Marcação positiva para cromossomo Y (pontos verdes) em alguns núcleos da amostra numero _____	56
FIGURA 6- Série Z (detalhe) da amostra anterior evidenciando marcação para cromossomo Y(verde) no núcleo em azul _____	56

FIGURA 7- Marcação positiva da amostra anterior para Citoqueratina AE1/AE3 (em vermelho)_____ 57

FIGURA 8 - Série Z da amostra numero 4, evidenciando marcação positiva para o cromossomo Y (verde) em alguns núcleos (vermelho)_____ 57

RESUMO

Objetivo: O Microquimerismo se refere a uma pequena quantidade de células ou DNA de um indivíduo presentes em outro indivíduo. O seu papel nas doenças autoimunes com semelhanças à doença do enxerto contra o hospedeiro tem sido muito estudado. Este trabalho teve como objetivo determinar se o microquimerismo do cromossomo-Y está presente em glândulas salivares labiais de mulheres submetidas a transplantes de células tronco hematopoiéticas com doadores do gênero masculino.

Metodologia: onze amostras de glândulas salivares labiais de pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas alogênicos foram obtidas dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. Nenhum dos autores teve conhecimento prévio do grau de cGVHD das mesmas. Destas amostras, cinco eram de transplante entre gêneros feminino-feminino (grupo controle) e cinco entre masculino-feminino (grupo estudo), além de uma do gênero masculino (controle positivo). Hibridização *in situ* por fluorescência com sonda para cromossomo-Y e imunofluorescência para anticitoqueratina AE1/AE3 foram utilizadas para identificar células epiteliais glandulares positivas para cromossomo-Y.

Resultados: Todas as pacientes do grupo estudado tiveram marcação positiva para o cromossomo-Y e para citoqueratina AE1/AE3 quando comparadas com o controle positivo. Nenhuma amostra do grupo controle se mostrou positiva para cromossomo-Y.

Conclusão: O microquimerismo nas glândulas salivares labiais de pacientes submetidas a transplante de células tronco hematopoiéticas com doadores do gênero masculino é um fenômeno real.

Palavras-chave: microquimerismo, cromossomo-Y, glândulas salivares menores, transplante de células tronco hematopoiéticas, DECH, GVHD.

MICROCHIMERISM IN LABIAL SALIVARY GLANDS OF HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTED PATIENTS

ABSTRACT

OBJECTIVE: Microchimerism represents a small portion of cells or DNA from one individual in another one. It has been extensively investigated in autoimmune diseases, which display similarities with graft-versus-host disease. The aim of this study was to investigate the presence of microchimerism in minor salivary glands of hematopoietic stem cell transplanted patients, one of the targets of graft-versus-host disease.

METHODS: Labial salivary glands biopsy specimens from 11 stem cell transplanted patients were analyzed. The samples were grouped in control (5 specimens from a female-to-female transplantation) and study group (5 glands from male-to-female transplantation). One male transplanted patient was used as a positive control. Fluorescence in-situ hybridization with Y-chromosome probe and immunofluorescence anticytokeratin AE1/AE3 were used to identify Y-chromosome positive glandular epithelial cells from these patients who have received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

RESULTS: All samples were positive to Y-chromosome and cytokeratin AE1/AE3, in agreement with the pattern exhibited by male labial salivary gland. None of the samples from control group (female-to-female transplantation) were positive to Y-chromosome despite being positive to cytokeratin AE1/AE3.

CONCLUSION: Microchimerism in the labial salivary glands of sex-mismatched stem cell transplanted patients is a real phenomenon. Further studies are necessary to elucidate the impact of this phenomenon on the clinical status of stem cell transplanted patients.

Key Words: microchimerism, Y-chromosome, minor salivary glands, hematopoietic stem Cell transplant, GVHD.

1 INTRODUÇÃO

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) vem sendo cada vez mais utilizado no tratamento de diversas condições hematológicas, oncológicas, imunológicas e genéticas. Porém, após o transplante o paciente pode apresentar a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), um fenômeno mediado pelo sistema imunológico, que ocorre quando células ou tecidos imunocompetentes são transplantados a um receptor imunoincompetente. Os linfócitos T presentes no enxerto atuam contra o organismo do receptor provocando lesões em diversos órgãos, uma condição mediada imunologicamente.

A DECH pode ocorrer nas formas aguda e crônica, acometendo múltiplos órgãos e tecidos mas podendo ocorrer em mucosa bucal e glândulas salivares. A forma aguda possui uma alta taxa de complicações e evolução dos pacientes ao óbito, fazendo com que o indivíduo tenha de ser submetido à terapia imunossupressora agressiva neste período.

A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) é uma complicação comum do transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), sendo mais freqüentemente verificada nos pacientes submetidos ao transplante alogênico (entre indivíduos imunologicamente compatíveis). Lesões bucais de DECHc podem apresentar-se em graus variados, de acordo com a intensidade do quadro. No entanto, esta condição possui um efeito conhecido como enxerto-versus-tumor, que protegeria da recidiva de condições como a Leucemia, podendo então ser desejada clinicamente, desde que controlada.

O TCTH alogênico leva ao desenvolvimento no receptor de um fenômeno conhecido como quimerismo, que representa a presença de populações celulares

derivadas de outro indivíduo. O monitoramento do quimerismo é realizado por muitos centros de transplante para predição de rejeição, falha do enxerto ou recidiva da doença, além da possibilidade de desenvolvimento de DECH. O Microquimerismo se refere ao baixo quimerismo ou uma pequena quantidade de células ou DNA de um indivíduo presentes em outro indivíduo. O papel do microquimerismo nas doenças autoimunes tem sido extensamente investigado, sendo encontradas correlações positivas em algumas delas.

Considerando que o microquimerismo poderia estar relacionado à DECHc de glândulas salivares labiais (GSL), o objetivo deste trabalho foi investigar a possibilidade de ocorrência do microquimerismo em GSL de pacientes submetidas ao TCTH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Transplante de medula óssea (TMO)/Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH)*

Os primeiros relatos de trabalhos envolvendo transplante de medula óssea foram feitos por Jacobson *et al.* (1949), quando verificaram que esplenócitos ou células de medula óssea protegiam camundongos de doses letais de radiação. Marcadores genéticos foram utilizados para demonstrarem que ocorria reconstituição hematológica a partir de células do doador.

Os resultados dos primeiros transplantes de medula óssea não foram animadores, com evolução ao óbito, uma vez que foram utilizados em pacientes terminais (BORTIN, 1970). Contudo, com a descoberta dos antígenos leucocitários humanos (HLA) e dos antígenos principais de histocompatibilidade (MHC), bem como de novas drogas imunossupressoras, foi possível que as técnicas de TMO evoluíssem rapidamente, resultando nos primeiros transplantes realizados em humanos, no final da década de 60 e início dos anos 70 (THOMAS *et al.*, 1975a, b).

Os estudos com agentes alquilantes (ciclofosfamida) na mielossupressão em ratos e macacos motivaram o início da substituição da irradiação corpórea total (ICT). Derivados de dimetilbussulfano começaram a ser estudados em cães, com êxito na “pega” do enxerto (STORB *et al.*, 1977). Um esquema de condicionamento alternativo à ICT utilizando o bussulfano associado à ciclofosfamida foi descrito por Santos *et al.* (1983).

A realização do TMO alogênico deveria obedecer a dois primeiros estágios: necessidade de se encontrar um doador compatível e condicionamento do receptor com quimioterapia associada ou não à ICT, por período de 5 a 10 dias antes do TMO, com o

objetivo de eliminar células malignas e deixá-lo apto a receber o transplante (CARL, 1984). Segundo Storb; Deeg (1986), a ICT foi amplamente utilizada nos condicionamentos de TMO, sendo que a sua utilização fracionada resultou em menos efeitos colaterais.

As razões para a falha no TMO foram listadas por Tutschka (1986), sendo: regime preparatório com toxicidade em outros órgãos que não a medula; toxicidade medular do regime preparatório que poderia prejudicar a incorporação do enxerto e favorecer infecções; DECH aguda (DECHa); infecções oportunistas e recorrência da doença.

Tutschka *et al.* (1987) descreveram um esquema de condicionamento utilizando baixas doses de bussulfano e ciclofosfamida, resultando em menores efeitos colaterais.

Freedman (1988) relatou a utilização do TMO no tratamento de diversas doenças hematológicas ou em outras condições. Bortin (1988) relatou a realização de cerca de 20 mil transplantes alogênicos entre 1960 e 1987, sendo a maioria deles para o tratamento de doenças não neoplásicas.

Durante o TMO, cerca de 10ml/Kg de aspirado de medula óssea é infundido endovenosamente no receptor, sendo que o sinal de “pega” ou incorporação do enxerto é o aumento do número de granulócitos acima de 500 céls./mm³ por dois dias consecutivos (APPELBAUM, 1988).

Apenas 35% dos candidatos ao TMO possuem um doador compatível, entretanto familiares parcialmente compatíveis podem ser utilizados como doadores e, conseqüentemente, aumentando a incidência e gravidade da DECH em relação direta com o grau de incompatibilidade (TABAK, 1991).

Além disso, Tabak (1991) afirma que as células imunocompetentes do receptor são capazes de reconhecer e rejeitar a medula óssea transplantada, mesmo quando o

receptor e o doador são HLA idênticos, pois os antígenos menores de histocompatibilidade podem servir de alvo para a rejeição. Esta situação justificaria o uso de terapia imunossupressora no TMO, com o intuito de prevenir a rejeição.

O importante papel dos patologistas no monitoramento e na recuperação de pacientes submetidos ao TMO, bem como no reconhecimento de várias condições patológicas que podem ocorrer, foi enfatizado por Bombi *et al.* (1992). Estas contribuições poderiam estar relacionadas às mudanças decorridas do condicionamento prévio, à DECH, à identificação de infecções e à recorrência da doença.

Tabak (1993) ressaltou que o TMO poderia ser a única opção de cura para diversas condições, mas não seria isento de complicações, decorrentes da DECH e secundários à quimioterapia agressiva.

A ICT, mesmo em doses fracionadas, gera efeitos precoces e tardios relativos à sua toxicidade, que incluem náusea, mucosite, diarreia e até alterações de crescimento, endócrinas, pulmonares e carcinogênicas (BANDINI *et al.*, 1994).

Amos; Gordon (1995) estabeleceram alguns parâmetros para classificação do TMO:

- Quanto ao tipo de doador: alogênico, entre indivíduos diferentes da mesma espécie; autólogo, utilizando-se a medula do próprio indivíduo e singênico, entre gêmeos idênticos;
- Quanto ao grau de parentesco: aparentado, entre parentes de primeiro grau; não aparentado, sem vínculo familiar de primeiro grau;
- Quanto à semelhança do HLA: compatível, onde há semelhança entre os antígenos de histocompatibilidade do doador e do receptor; incompatível, onde não há semelhança dos HLAs;

- Quanto à fonte de células progenitoras: medula óssea (MO), obtida por aspiração da crista ilíaca; células tronco periféricas (Transplante de células tronco hematopoiéticas – TCTH), obtidas pelo aspirado do sangue periférico de veia central; e sangue de cordão umbelical (SCU).

Weddel *et al.* (1995) relataram que a infecção seria a causa mais comum de morbidade e mortalidade durante e após o TMO, podendo ser reduzida pela utilização de ambientes protegidos, diminuindo o potencial de infecções exógenas. Apesar da profilaxia, os organismos oportunistas endógenos seriam a maior causa de ameaça vital para o paciente, principalmente na fase anterior à incorporação do enxerto.

O tempo aproximado para a repopulação da medula do receptor a partir da medula do doador variaria entre três a quatro semanas do TMO, podendo ser abreviado pela utilização de fatores de crescimento para estimulação dos granulócitos (SALE *et al.*, 1995).

Corrêa (1999) relatou que o agente antineoplásico deve ter capacidade de interferir no metabolismo ou no ciclo reprodutivo de células tumorais, com a finalidade de destruí-las, com o menor índice de toxicidade possível. Porém, outros efeitos tóxicos são frequentemente observados.

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) tem sido usado cada vez mais no mundo, como modalidade terapêutica para pacientes diagnosticados com várias doenças hematológicas malignas ou não, incluindo leucemias agudas e crônicas, anemia aplásica, síndromes mielodisplásicas, imunodeficiência acentuada, linfomas e alguns tumores sólidos selecionados (GOMEZ *et al.*, 2004). Além disso, vem sendo utilizado para tratamento de algumas doenças auto-imunes (SCHUBERT; CORREA, 2008).

2.2 *Transplante de células tronco hematopoiéticas e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)*

Barnes *et al.* (1956) fizeram o primeiro relato da chamada doença secundária, que agora é referida como DECH. Billingham (1966, 1967) descreveu os três requisitos imunológicos para desenvolvimento da DECH: o enxerto deve conter células imunocompetentes; o receptor não deve possuir isoantígenos do enxerto, sendo capaz de estimulá-lo antígenoicamente; e o hospedeiro deve ser incapaz de manter uma reação imunologicamente efetiva contra o enxerto.

Touraine *et al.* (1975) e Saurat *et al.* (1975) descreveram os primeiros casos correlacionando DECH ao líquen plano. A DECH foi identificada como fator etiológico para as reações liquenóides.

Thomas *et al.* (1975b) relataram a utilização de um estadiamento da DECH classificando os pacientes em dois grupos: os que tinham expectativa de sobrevida de 55%, que não apresentavam DECH evidente clinicamente ou apresentavam envolvimento de pele; e os do segundo grupo, com expectativa de sobrevida de 15%, que apresentavam envolvimento pela DECH em pele, fígado e intestino em graus variáveis.

Lawley *et al.* (1977) correlacionaram o desenvolvimento da DECH ao transplante de células ou tecidos imunocompetentes a um receptor imunoincompetente. Um caso de doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECHc) associada à esclerodermia cutânea, xerofthalmia e xerostomia, com semelhança à síndrome de Sjögren também foi relatado pelos autores.

Gratwohl *et al.* (1977) e Lawley *et al.* (1977) foram os primeiros a relatarem o uso da biópsia de lábio no diagnóstico de DECHc. Os autores observaram que as

manifestações clínicas eram semelhantes à síndrome de Sjögren e o histológico revelava infiltrado inflamatório na mucosa labial e nas glândulas salivares.

A DECHc foi identificada como um sério problema, afetando cerca de 25% dos pacientes de TMO alogênico que sobreviveram 100 dias ou mais (SHULMAN *et al.*, 1978). O dia 100 pós-transplante foi escolhido como ponto de referência para determinar a incidência de DECHc devido a três razões: a) parecia haver uma perspectiva mais acurada de cronicidade do problema; b) o paciente poderia estar na fase quiescente antes deste dia; c) alguns pacientes não desenvolveram achados mais característicos da DECHc do que da DECH aguda. Apesar das diferenças entre as fases poderia ocorrer confusão, em virtude da fase quiescente entre as duas.

Sullivan *et al.* (1981) relataram que 52 pacientes de um total de 175 sobreviventes de TMO alogênico desenvolveram DECHc (30%). Os sintomas bucais incluíam queimação, irritação com alimentos ácidos e ressecamento, enquanto os achados incluíam eritema, ulcerações, estrias e cáries. Vinte e nove pacientes foram submetidos a biópsias bucais com achados histológicos que incluíram mucosite semelhante a líquen plano ou lúpus eritematoso, e sialodinite fibrosante das glândulas salivares labiais (GSL), semelhante à síndrome de Sjögren. O diagnóstico precoce e a terapia para DECHc seriam essenciais para melhorar a sobrevida e diminuir a morbidade pós-TMO.

Segundo Rapoport *et al.* (1979) e Thein *et al.* (1981), a DECH também ocorre nos TMO singênicos e autólogos, sendo considerada a possibilidade de deficiência no reconhecimento dos antígenos do próprio hospedeiro, desenvolvendo, deste modo, um processo auto-imune relacionado à DECH.

Sale *et al.* (1981) relataram associação estatisticamente significativa da sialodinite e da dacrioadenite (inflamação da glândula lacrimal) à DECH, estabelecendo

um critério histológico de classificação para as glândulas afetadas, respectivamente as salivares menores e as lacrimais. O critério estabelecia dois graus, sendo grau I, quando ocorria infiltrado inflamatório crônico e sialodenite ou dacrioadenite; e grau II, quando se somava ao grau I a necrose epitelial da mucosa bucal; dilatação, necrose das células epiteliais e invasão por linfócitos nos ductos glandulares. Os autores também encontraram evidências da ocorrência destas alterações nas duas formas da DECH, aguda e crônica.

Rodu; Gockerman (1983) caracterizaram a reação clínica da DECHc por uma queratose liquenóide de mucosa com achados histológicos semelhantes ao líquen plano na mucosa e, nas GSL, semelhantes à síndrome de Sjögren. Os autores enfatizaram que os achados bucais são de importante valor no reconhecimento precoce, bem como para o acompanhamento da doença.

Schubert *et al.* (1984) realizaram um estudo acompanhando 60 pacientes de 180 a quinhentos dias pós-TMO alogênico para identificar as características clínicas (Quadro 1) e histopatológicas das lesões bucais de DECHc. Os pacientes foram submetidos à biópsia incisional de lábio inferior de aproximadamente, 6 x 3 mm de tamanho, a 10 mm de distância do vermelhão do lábio, fixados em formol a 10% e corados com HE e PAS (Quadro 2).

QUADRO 1**Características clínicas da DECHc, segundo Schubert *et al.* (1984).**

Cor	Tecidos bucais hipocorados ou hiperemiados
Atrofia	Perda de ceratinização e/ou diminuição da espessura da mucosa associada ao eritema; atrofia das papilas linguais
Aparência liquenóide	Eritema difuso com placas, pápulas ou estrias levemente elevadas, atrofia das papilas filiformes
Vascularização	Aumento do número ou tamanho dos elementos vasculares na submucosa
Estomatite angular	Inflamação ou ulceração das comissuras labiais
Glândulas salivares menores palatinas inflamadas	Eritema dos orifícios dos ductos
Dor oral	Dor generalizada, não específica, espontânea e/ou induzida
Xerostomia	Sensação de diminuição do fluxo salivar

QUADRO 2

Características histológicas da DECHc, segundo Schubert *et al.* (1984)

Glândulas salivares menores	Infiltração linfocítica difusa
	Infiltração linfocítica periductal
	Atrofia ou destruição dos ácinos
Mucosa bucal	Infiltração linfocítica subepitelial
	Degeneração das células basais
	Necrose das células ductais

A partir das observações clínicas e histopatológicas, Schubert *et al.* (1984) verificaram uma semelhança entre DECHc e as várias lesões bucais que ocorrem em doenças autoimunes. Reações liquenóides associadas à mucosa atrófica e eritematosa assemelham-se a lesões de líquen plano, lupus eritematoso, lesões ulceradas e estriadas. Pode ocorrer uma resposta gengival eritematosa intensa e atrófica que lembra o penfigóide benigno de mucosa. Os pacientes que relataram ressecamento bucal apresentavam mudanças salivares quantitativas e qualitativas decorrentes de necrose ductal, sialodenite, infiltração linfocítica epitelial e destruição acinar semelhantes à síndrome de Sjögren. A dor bucal foi relacionada à atividade de DECHc após interrupção do tratamento com imunossupressores.

A forma aguda da doença se inicia cerca de 13 a 68 dias pós-TMO, enquanto a forma crônica aparece por volta de 100 dias de transplante (dia + 100). A forma crônica pode aparecer como uma evolução da forma aguda, seguindo um período quiescente após resolução clínica da fase aguda ou, ainda, de forma tardia (Barrett; Bilous, 1984).

A DECH é uma séria complicação resultante de uma reação imunológica provocada pelos linfócitos T do doador contra os tecidos do receptor, afetando múltiplos órgãos. O envolvimento da pele e superfícies mucosas da região de cabeça e pescoço, em particular da boca, ocorre em grande número de pacientes. As características clínicas e histológicas variam de acordo com o tempo de instalação da condição. O exame clínico da região de cabeça e pescoço e a biópsia da mucosa bucal são importantes, não só para diagnóstico, mas também para avaliação do progresso e da resposta da DECH ao tratamento (MEDINA *et al.*, 1984).

A DECH é uma complicação comum em pacientes submetidos ao transplante alogênico, que se desenvolve através do ataque de linfócitos T transplantados a vários tecidos do receptor, devido às diferenças nos antígenos maiores e menores de histocompatibilidade (SULLIVAN, 1986).

Fujii *et al.* (1988) analisaram, através de reações de imunistoquímica, lesões bucais de pacientes submetidos ao TMO alogênico com DECH, obtendo achados que sugeririam a imunidade celular mediada por células T citotóxicas como responsável pela patogênese das lesões liquenóides de DECH.

Kolbinson *et al.* (1988) afirmaram que a DECHa pode se iniciar, em média, 18,5 dias pós-TMO, com manifestações bucais como descamação dolorosa, ulceração de mucosa bucal, queilite, estrias liquenóides e eritema. A maioria dessas alterações não seria específica, podendo estar associadas ao regime de condicionamento.

A DECH observada nos transplantes de medula óssea singênico e autólogo fez com que Vogelsang *et al.* (1988) acrescentassem a hipótese de reconhecimento inapropriado dos antígenos do próprio hospedeiro como um processo auto-imune, chamado de síndrome do enxerto contra o hospedeiro.

Dahllöf *et al.* (1988, 1989) relataram que todas as crianças que apresentaram DECHc clínica exibiram alterações em mucosa bucal do tipo eritema, atrofia do dorso da língua e lesões liquenóides, observadas no período de dois a quatro anos após o TMO.

Wagner Jr *et al.* (1989) também verificaram a presença de DECH em TMO alógeno, singênico e autólogo. A DECHa estaria associada a alta morbidade e alta mortalidade, com metade dos pacientes evoluindo ao óbito pela doença ou complicações da terapia. Um ataque imunológico dos linfócitos T contra os tecidos do receptor resultaria numa complexa síndrome tendo como principais manifestações clínicas a febre, o rash cutâneo, a diarreia e a disfunção hepática. Já a DECHc apresentaria três padrões clínicos de envolvimento da mucosa bucal: a) exantema papular; b) erupção liquenóide e c) processo descamativo com esfoliação de placas mucosas e esbranquiçadas. Quanto ao tempo de ocorrência, a DECHa ocorreria nos três primeiros meses e a crônica se manifestaria no período de três a seis meses pós-TMO.

Nakhleh *et al.* (1989) defenderam o uso da biópsia de lábio em forma de cunha para garantir a inclusão de mucosa bucal e GSL. Esta biópsia, facilmente obtida, é muito usada para estadiamento da DECHc. Os autores relataram a possibilidade de uma correlação importante das alterações de mucosa e GSL com o grau de DECHc sistêmica, sendo que as glândulas salivares seriam melhores para revelar esta relação.

Vários testes são feitos entre os dias 90 e 100 pós-TMO para determinar se os pacientes têm DECHc. Os pacientes com DECHc ativa seriam avaliados quanto à instituição ou continuidade da terapia imunossupressora, com o intuito de se evitar a generalização da condição, que leva ao aumento da morbidade e mortalidade (WINGARD *et al.*, 1989).

Cerca de 30 a 50% dos pacientes que sobrevivem seis meses ou mais após TMO com HLA idêntico de irmão desenvolvem DECHc. A média de tempo para início é de 3 a 4 meses pós-TMO, mas as manifestações bucais podem ocorrer desde 70 dias até 15 meses pós-TMO. O infiltrado celular mononuclear observado em biópsias de pele e lábio é composto predominantemente de linfócitos CD+8 (ATKINSON, 1990).

Lishner *et al.* (1990) descreveram o aparecimento de carcinomas de células escamosas em pacientes submetidos ao TMO, estabelecendo uma possível correlação com a terapia imunossupressora para prevenção de DECH. Três pacientes tiveram manifestação dos carcinomas em áreas envolvidas por DECH crônica.

O reconhecimento de antígenos distintos nas células do doador pelas células imunocompetentes do receptor pode levar à rejeição do enxerto. No entanto, os linfócitos T do doador podem reconhecer antígenos específicos no hospedeiro, determinando o aparecimento da DECH, responsável em grande parte pela morbidade e mortalidade nos transplantes alogênicos (TABAK, 1991).

Bombi *et al.* (1992) mencionaram que o resultado de uma biópsia de pele realizada no dia +100 teria um fator preditivo de desenvolvimento de DECHc, mas que a ação dos agentes usados no condicionamento do paciente sobre a pele diminuiria o valor da detecção.

O índice de recidivas da doença primária em pacientes que apresentaram DECH aguda ou crônica é menor, porém o efeito na sobrevida pode ser negativo, devido ao aumento de complicações. O estabelecimento do dia +100 (100 dias após TMO) como divisor entre a DECH aguda e crônica é arbitrária, mas serviria com referência para avaliações dos pacientes. A DECHc acomete cerca de 20 a 40% dos pacientes que sobrevivem pelo menos 100 dias após o procedimento, sendo a complicação tardia mais freqüente (TABAK, 1992).

Segundo Mattson *et al.* (1992), a DECH seria um dos fatores que limitariam o sucesso do TMO, sendo uma importante causa de complicações ou falha do transplante em 30 a 70% dos casos.

A DECHc poderia se manifestar como úlceras bucais, bolhas e descamação de mucosa, frequentemente associada a achados liquenóides, com prevalência variando de 20 a 33,3% (WOO *et al.*, 1993).

Okunewick *et al.* (1993) relataram que o gênero do doador poderia interferir na susceptibilidade à DECH, nos casos de receptores e doadores com gêneros diferentes. Os autores relataram que, nestes casos, parecia haver uma reação do enxerto contra os antígenos de histocompatibilidade relacionados ao cromossomo Y ou ao X.

Ghalie *et al.* (1994) não encontraram correlação entre o desenvolvimento de DECH e os parâmetros idade do paciente, diagnóstico, gênero do doador, gênero do receptor, idade do doador, doador de gênero diferente do receptor e contagem de neutrófilos $>1000 \times 10^6$ cels/l.

A boca estaria envolvida em 80% dos casos de DECH tendo a xerostomia como achado interessante, com as glândulas salivares menores exibindo características histopatológicas da síndrome de Sjögren (CURTIS; CAUGHMAN, 1994).

Hiroki *et al.* (1994) avaliaram 10 pacientes com DECHc clínica que foram submetidos a biópsia de mucosa bucal e GSL no período de 100 a 200 dias pós-TMO. Os espécimes de GSL foram avaliados de acordo com o grau de infiltração linfocítica difusa, a presença de infiltração linfocítica periductal e atrofia ou destruição do ácino. Os estudos imunoistoquímicos mostraram que havia predominância de células T CD8+ sobre CD4+ em GSL e em mucosa bucal estariam em número semelhantes. Os autores verificaram que as alterações de GSL refletiam anormalidades em outros órgãos e que

os achados seriam mais úteis no estadiamento da DECHc do que os outros órgãos envolvidos.

Weddell *et al.* (1995) relataram que a DECHc comumente envolve mucosa bucal, manifestando-se como úlceras ou eritemas dolorosos, erupções reticulares e liquenóides ou descamação. Poderia, ainda, ser acompanhada por disfunção das glândulas salivares com xerostomia, disfagia e disgeusia. A utilização de bochechos com dexametasona poderia ser de grande auxílio nos casos graves.

O Quadro 3 agrupa os critérios histopatológicos propostos por Horn (1995) para classificação do grau de DECHc.

Em pacientes mantidos sob terapia imunossupressora ou nos casos de DECHc persistente, a avaliação da atividade da DECHc é mais difícil. Frequentemente há um dano e fibrose residuais, sendo que a inflamação pode estar escassa (SALE *et al.*, 1995). Esses mesmos autores fizeram uma análise cronológica das biópsias de lábio entre os dias 80 e 600, que revelaram alterações variando de reações liquenóides pronunciadas a atrofia tardia da mucosa. Nas GSL, a inflamação estava centralizada primariamente sobre o epitélio do ducto e raramente foi verificado infiltrado inflamatório marcante, como usado em estudos prévios para graduar a síndrome de Sjögren. A inflamação foi seguida pela destruição das glândulas, com degeneração mixóide intersticial e involução fibrosa dos lóbulos. As biópsias de pacientes que responderam ao tratamento para DECHc apresentavam lóbulos fibróticos adjacentes às GSL normais.

QUADRO 3

Classificação da DECHc proposta por Horn (1995)

Grau de DECHc	Características histopatológicas
I	<p>Mucosa: Vacuolização das células basais, moderado infiltrado linfocitário e moderada exocitose epitelial.</p> <p>GSL: moderado infiltrado intersticial.</p>
II	<p>Mucosa: Vacuolização basal, células epiteliais disceratóticas, necrose de queratinócitos com satelitose, moderado a intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria e moderada exocitose epitelial.</p> <p>GSL: moderada destruição acinar, dilatação ductal, metaplasia escamosa, acúmulo de muco, fibrose moderada, proliferação de células ductais e infiltrado linfocítico periductal.</p>
III	<p>Mucosa: clivagem focal entre epitélio e lâmina própria, intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria, células epiteliais disceratóticas e exocitose linfocitária.</p> <p>GSL: marcado infiltrado linfocitário intersticial, com destruição difusa dos ácinos e ductos.</p>
IV	<p>Mucosa: separação do epitélio e da lâmina própria.</p> <p>GSL: completa perda dos ácinos, ductos marcadamente dilatados e fibrose intersticial com ou sem infiltrado inflamatório.</p>

O diagnóstico precoce e preciso da DECHc é fundamental, uma vez que é uma das mais sérias complicações pós-TMO alogênico. Muitos dos sinais ou sintomas na pele e fígado são inespecíficos e normalmente confundidos com outras alterações. Os achados histológicos nas GSL e mucosa bucal refletem a proximidade do estado da doença crônica e o grau de infiltrado inflamatório parece relacionar-se à severidade da doença e à manifestação em outros órgãos. Além disso, alterações em GSL não estão

necessariamente associadas a lesões de mucosa bucal. Pacientes sem alterações clínicas com diagnóstico anatomopatológico de DECHc de mucosa bucal e GSL tendem a desenvolver a doença como disfunção hepática e pneumonia intersticial. As alterações da glândula parótida também podem estar presentes, como o aumento de volume e a dor (NAKAMURA *et al.*, 1996).

Nagler *et al.* (1996) associaram a disfunção das glândulas salivares (hipossalivação) presente na DECH aguda e crônica à gravidade do quadro, comprovada através de cintilografia das glândulas salivares maiores.

Woo *et al.* (1997) relataram que apesar da profilaxia, a DECH continuaria a representar a maior complicação do TMO alogênico, ocorrendo em 25 a 70% dos casos. Segundo os autores, a pele, o trato gastrointestinal e o fígado seriam os órgãos primariamente afetados.

Yamada *et al.* (1997) sugeriram que citocinas poderiam ativar as células “natural killers” que influiriam diretamente no dano citotóxico observado nas manifestações de DECH, contestando a visão de que a DECH fosse mediada por células T.

Fujiwara *et al.* (1997) observaram, em trabalhos experimentais com ratos, que o tipo celular mais proeminente observado na lâmina própria era de forma dendrítica, reforçando a possibilidade de células MHC classe II+ apresentarem antígenos durante indução de resposta imunológica local à DECH.

Um estudo retrospectivo de 34 fatores considerados de risco para o desenvolvimento de DECHc, envolvendo 451 pacientes submetidos a TMO alogênico, foi realizado por Carlens *et al.* (1998). Dentre os indivíduos, 334 eram aparentados HLA idênticos e 87 não-aparentados, sendo observados após o 3º mês do TMO. A incidência acumulada em cinco anos foi de 45%. A idade avançada do receptor foi o fator preditivo de maior influência ($p=0,001$). Na análise multivariada, a DECHa prévia

($p=0,001$), doadoras femininas para receptores masculinos ($p=0,006$) e leucemia mielóide crônica ($p=0,014$) em comparação a outras doenças de base, foram estatisticamente significativas. Nos pacientes submetidos ao TMO HLA idêntico que receberam profilaxia com MTX e CsA, a idade do receptor e LMC foram os fatores mais importantes.

Wagner *et al.* (1998) realizaram um estudo para verificar a relação entre os exames utilizados para avaliar a DECHc, em torno dos dias 70 e 120 após o TMO alogênico, e o impacto do uso de corticosteróides 100 dias após o TMO. Os autores avaliaram retrospectivamente 241 paciente que receberam MTX e CsA para profilaxia da DECH e que sobreviveram sem recidiva por no mínimo 4 meses. Pacientes que desenvolveram DECH foram comparados aos que não desenvolveram, com a finalidade de avaliar o papel dos testes em prever a possibilidade de desenvolvimento de DECHc extensa, tais como: biópsia de pele, biópsia de lábio, teste de Schirmer, fosfatase alcalina sérica, aspartato transaminase, nível de imunoglobulina e contagem de plaquetas. Em análise univariada, o exame bucal positivo e a baixa contagem de plaquetas foram preditivos de desenvolvimento de DECHc extensa. Na multivariada, acrescida de outros fatores de risco, como idade e história de DECHa, os fatores que tiveram maior associação com o desenvolvimento de DECHc foram a história de DECHa e o uso de corticosteróides no dia +100 ($p=0,0001$). O uso de corticosteróides para DECHa no dia +100 teve um efeito preditivo de desenvolvimento de DECHc independente do grau da DECHa ($p=0,004$). No entanto, 55% dos pacientes tinham doadores não totalmente compatíveis ou não aparentados, podendo desenvolver mais DECH aguda ou crônica.

Com base no resultado do estudo relatado anteriormente, Wagner *et al.* (1998) sugeriram que os pacientes fossem distribuídos em três diferentes grupos de risco para

desenvolvimento de DECHc: baixo, sem corticosteróides e história negativa de DECHa; intermediário, sem corticosteróides e com história positiva de DECHa; e alto, com corticosteróides no dia +100. Eles ainda concluíram que os testes avaliados não foram capazes de prever o desenvolvimento da DECHc.

O diagnóstico e estadiamento da DECHc pode ser feito a partir de espécimes de mucosa labial e glândulas salivares labiais obtidas através de biópsia realizada no dia +100 (SCHUBERT *et al.*, 1999).

Corrêa (1999) concluiu com base nos achados de seu trabalho que: a glândula salivar revelaria melhor o grau da DECHc que a mucosa bucal e a pele; a história de DECHa pregressa; os doadores do gênero feminino para receptores do gênero masculino e o tipo de TMO se mostraram importantes na sobrevida dos pacientes. A DECHa, o tipo de transplante e o gênero do doador foram importantes fatores preditivos de DECHc. Uma sobrevida menor estaria relacionada aos pacientes com acometimento de GSL e mucosa bucal em graus histológicos crescentes.

Segundo Nagler *et al.* (1999) a patofisiologia da xerostomia e da hipossalivação observadas na DECH poderia ser resumida como causada por regulação do HLA, infiltração mononuclear e desregulação das citocinas.

A DECHc estaria diretamente relacionada ao efeito enxerto versus hospedeiro (EVT) que ocorre após o TMO alogênico e que a depleção das células T do enxerto, realizada previamente ao TMO, resultaria em aumento da recidiva da doença neoplásica primária (MURPHY; BLAZAR, 1999). Os mesmos autores descreveram o papel do condicionamento na DECH através da indução de citocinas, anteriormente ao recebimento do TMO propriamente dito. As múltiplas fases da DECH também foram descritas pelos autores como 'fase de indução', onde as células T doadas percebem aloantígenos e então se tornam ativadas e se expandem por clonagem, na 'fase de

expansão'. Estas células T liberam, então, citocinas (fase chamada 'tempestade de citocinas') e possivelmente quimiocinas, que resultam no recrutamento de outros tipos de células (macrófagos, granulócitos, células 'natural killer', etc.), na 'fase de recrutamento'. Finalmente, as células T e os outros tipos de células poderiam mediar a patologia associada com a DECH (a 'fase do efeito'). Segundo os autores, as citocinas dirigem a resposta imune e desempenham um papel primordial em todas as fases da DECH.

Levy *et al.* (2000) relataram que a xerostomia grave observada em alguns pacientes com DECHc seria um fenômeno de longa-vida, uma vez que o parênquima glandular funcional é perdido e repostado por tecido fibroso. Desta forma, uma terapia com pilocarpina oral ou outros compostos terapêuticos poderia ser indicada.

Segundo Cohen *et al.* (2000), o sangue de cordão umbilical (SCU) tem um alto número de células com potencial de proliferação e é, portanto, uma fonte alternativa de células hematopoiéticas para transplante alogênico. Além disso, haveria uma maior disponibilidade de SCU a baixo custo se comparado à MO, sendo que a severidade da DECH é menor na utilização desta fonte. A produção de células T, macrófagos e células 'natural killer' são reduzidas no SCU, em comparação ao sangue de adultos. A habilidade das células do cordão em responder às citocinas e também de manter a resposta inflamatória é diminuída e se deve, provavelmente, à baixa expressão de receptores de citocinas. Apesar disto, casos de DECH grave estão relatados na literatura com SCU, provavelmente devido à habilidade do organismo em sintetizar citocinas e a uma predisposição genética.

Gomez *et al.* (2001) descreveram uma proposta de classificação histopatológica para DECHc bucal com base na intensidade do infiltrado inflamatório presente. A classificação dá ênfase às GSL em virtude de refletirem mais fielmente o estado

sistêmico dos pacientes. Foram avaliados seis campos histológicos no aumento de 400X (microscópio ótico), realizando-se contagens de infiltrado inflamatório. Foram consideradas DECHc ausente, as amostras que apresentaram até 30 células inflamatórias nos 6 campos histológicos; DECHc leve, aquelas amostras que apresentavam na somatória dos 6 campos, entre 30 e 140 células inflamatórias; DECHc moderada, aquelas que apresentavam entre 141 a 250 células inflamatórias; e DECHc grave, aquelas que apresentavam acima de 250 células.

A DECH crônica comumente se manifesta na boca, através de reações liquenóides, atrofia de mucosa, eritema, úlceras e xerostomia (SOUZA *et al.*, 2004).

Filipovich *et al.* (2005) mencionaram que a DECH era tradicionalmente classificada em aguda ou crônica pelo momento de instalação após TCTH. Entretanto, um critério de consenso estabelecido pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) recomenda a classificação baseada nos sinais e sintomas e não temporal, como anteriormente. A DECHa frequentemente ocorre até 100 dias após TCTH, mas pode persistir através do tempo ou recorrer.

Apesar dos significativos avanços no conhecimento da patobiologia da DECH aguda e crônica e a melhora nas técnicas de sua prevenção e manejo, a mesma permanece como uma barreira significativa à expansão da utilização clínica e aplicação do TCTH alogênico (SCHUBERT; CORREA, 2008).

Imanguli *et al.* (2008) relataram que a DECHc é o principal impedimento para a expansão do uso do TCTH e que a mesma seria desenvolvida em cerca de 40 a 70 % dos pacientes que sobrevivessem à fase inicial do TCTH, podendo persistir por meses ou anos, e requerendo cuidados multidisciplinares por longo período de tempo.

2.3 Microquimerismo

O microquimerismo (MC) tem sido definido como uma mistura de pequeno número de células de diferentes indivíduos coexistindo nos tecidos, incluindo o sangue periférico (ANDO; DAVIES, 2003).

O desenvolvimento de MC após transplante de órgãos, transfusão de sangue e gravidez é um fenômeno reconhecido (STARZL, 1993; DZIK, 1995; BIANCHI *et al.*, 1996). As semelhanças entre algumas doenças auto-imunes e DECHc, que pode desenvolver-se após o TCTH, tem sugerido que as células microquiméricas do feto ou maternas podem ter um envolvimento na patogênese de algumas doenças auto-imunes (NELSON *et al.*, 1998).

KLINTSCHAR *et al.* (2001) verificaram a presença de microquimerismo fetal do cromossomo Y em mulheres com Tireoidite de Hashimoto que tiveram pelo menos um filho homem. Os resultados permitiram que os mesmos sugerissem a participação do microquimerismo no desenvolvimento da condição, embora não pudessem eliminar completamente a hipótese de que o microquimerismo seria somente um “espectador inocente” no processo desencadeado por outros mecanismos.

O Microquimerismo fetal é definido como a presença de células fetais em tecidos maternos, sendo este processo estabelecido durante a gravidez. Entretanto, microquimerismo no sangue fetal periférico que persiste no período pós-parto é considerado um evento natural e implica na indução da tolerância durante a gravidez. Evidências acumuladas sugerem que tecidos imunes fetais podem ser reativos aos antígenos maternos e, assim, ter a capacidade de gerar reações no hospedeiro. Isto deveria promover um mecanismo para a iniciação e/ou exacerbação da doença auto-imune (ANDO; DAVIES, 2003).

Recentemente tem sido sugerido que o microquimerismo pode ter um papel significativo na etiopatogenia de algumas doenças auto-imunes. Exames de correlação entre o microquimerismo e as manifestações clínicas e sorológicas presentes no paciente têm a possibilidade de esclarecer o mecanismo do microquimerismo nas condições auto-imunes (MOSCA *et al.*, 2003).

Estudos feitos em pacientes com esclerodermia têm mostrado uma significante maior prevalência de microquimerismo em pacientes com esclerodermia (entre 46-61,5%) que em controles saudáveis (entre 4-5%) (NELSON *et al.*, 1998; ICHICAWA *et al.*, 2001). A presença de microquimerismo também tem sido demonstrada em outras condições auto-imunes, como as miopatias juvenis idiopáticas inflamatórias (REED *et al.*, 2000), síndrome de Sjögren (KUROKI *et al.*, 2002) e lupus eritematoso sistêmico (MOSCA *et al.*, 2003). Juntamente com os achados de células fetais no sangue periférico materno, a presença destas células em vários tecidos maternos tem sido demonstrada. Devido às alterações imunológicas que caracterizam as doenças auto-imunes poderem se diferenciar grandemente, a possibilidade de que as células quiméricas interfiram na história natural das doenças auto-imunes por diferentes mecanismos foi sugerida (MOSCA *et al.*, 2003).

Embora o microquimerismo esteja possivelmente relacionado ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, nas lesões de líquen plano bucal de mulheres que tiveram filhos do gênero masculino não pôde ser identificada a presença do cromossomo Y (WEGER *et al.*, 2006). O mesmo havia sido observado anteriormente para leucócitos obtidos do infiltrado inflamatório de lesões bucais de líquen plano em outro grupo de pacientes semelhantes (LOMBARDI *et al.*, 2001).

Kuroki *et al.* (2002) e Endo *et al.* (2002) evidenciaram a existência de microquimerismo materno-fetal nas glândulas salivares labiais de mulheres com

síndrome de Sjögren que tiveram filhos do gênero masculino, através da identificação da presença de DNA masculino (Cromossomo Y). O microquimerismo poderia estar relacionado à inflamação presente na síndrome de Sjögren, sugerindo que o mesmo ocorreria devido à DECH induzida pelas células fetais nas mães (ENDO *et al.*, 2002).

As variáveis clínicas também são muito importantes, particularmente a história de gravidez, se o DNA masculino for usado como medida do microquimerismo (LAMBERT; NELSON, 2003).

Um estudo para verificação de microquimerismo fetal em pele afetada e não afetada de mulheres portadoras de esclerose sistêmica com pelo menos um filho do gênero masculino foi realizado por Sawaya *et al.* (2004). Os autores mencionaram que a presença de grande quantidade de células microquiméricas em pele clinicamente não afetada na esclerose sistêmica, antes da detecção de mudanças escleróticas evidentes, sugeriu que o influxo de células microquiméricas deveria preceder o desenvolvimento de fibrose. Isto proveria suporte adicional à hipótese de que o microquimerismo fetal deveria ter um papel na patogênese da esclerose sistêmica.

O'Donoghue *et al.*(2004) sugeriram que o microquimerismo fetal seria mais comum que o estimado, podendo ocorrer como um resultado incidental da gravidez sem significado biológico ou podendo ter conseqüências a longo prazo. Células fetais persistentes na medula e outros tecidos poderiam explicar porque as mulheres seriam piores doadoras de órgãos e medula para transplantes. Se as células fetais microquiméricas podem, como sugerido experimentalmente, ser ativadas por estímulo químico ou gravidez futura, ou induzir doença por alteração do sistema imune maternal permanece desconhecido. Entretanto, células fetais na medula maternal poderiam também atuar como reservatórios de células tronco e explicar porque as mulheres vivem

mais que os homens e porque a gravidez protege contra susceptibilidade a algumas doenças.

Yan *et al.* (2005) investigaram o microquimerismo do cromossomo Y em mulheres sem filhos. Outras possibilidades de microquimerismo foram levantadas pelos autores, como aborto espontâneo não reconhecido, gêmeo masculino perdido, transferência de um irmão mais velho para a mãe, ou relação sexual.

O microquimerismo materno também foi investigado por Hayashida *et al.* (2007) em pacientes do gênero masculino com Atresia Biliar. A presença de células femininas no fígado de pacientes afetados pela condição citada foi significativamente maior do que nos pacientes com outras doenças hepáticas, levando à sugestão de que o microquimerismo maternal poderia contribuir para a patogênese da Atresia Biliar.

Vymetalova *et al.* (2008) avaliaram a presença de microquimerismo do cromossomo Y em 40 aortas torácicas de doadoras e receptoras do gênero feminino através de PCR, encontrando uma proporção de 47,5% de microquimerismo do cromossomo Y em DNA livre no plasma. Os autores afirmaram que o uso de DNA livre no plasma para detecção de rejeição de órgãos seria difícil e impraticável.

Dubernard *et al.* (2008) avaliaram mulheres com câncer de mama que estavam grávidas de fetos do gênero masculino quanto à presença de células fetais (FISH para cromossomo Y e imunistoquímica). Os achados permitiram que os mesmos concluíssem que é freqüente a presença de células fetais no estroma tumoral. Levando-se em conta que o estroma tem um papel importante na proliferação tumoral, estas células poderiam interferir no prognóstico destes carcinomas, levantando-se a possibilidade de utilização das mesmas como alvos terapêuticos para influenciar o comportamento tumoral.

Em um estudo experimental, Dubernard *et al.* (2009) verificaram que células fetais expressando citoqueratinas estavam sempre presentes em carcinomas de mama associados a gestação, sendo que os tumores de alto grau continham mais células fetais.

Os folículos pilosos de recipientes de TCTH constituem o tecido com a maior necessidade de regeneração após altas doses de quimioterapia. Sendo assim, Jacewicz *et al.* (2010) realizaram um estudo para verificar se o DNA do doador masculino poderia estar presente nos folículos pilosos das receptoras, conseguindo evidenciar esta presença mas não a constituição dos mesmos por 100% de células originadas do doador.

Gadi (2010) comparou a expressão do microquimerismo fetal do cromossomo Y em amostras de tecido normal de mamas de pacientes com carcinoma invasivo a de pacientes sem a doença que fizeram mamoplastia de redução. Os achados revelaram que no grupo das pacientes com mamas sem câncer ocorreu 63% de expressão do microquimerismo fetal, enquanto que no grupo das pacientes com câncer foi de 26%. Estes achados confirmariam a hipótese da proteção contra o câncer de mama associada ao microquimerismo fetal que havia sido detectada no sangue circulante e agora refletida no tecido mamário.

Estudos recentes têm destacado a presença de microquimerismo em vários enxertos sólidos, mas o significado biológico destas células quiméricas é controverso. Elas podem ser benéficas, levando à melhor tolerância dos enxertos ou participando do reparo tecidual ou, em contraste, deletéria, se envolvida em doenças crônicas (FERLICOT *et al.*, 2010). Os mesmos autores investigaram o microquimerismo em transplantes renais alogênicos de doadores do gênero feminino para receptores do gênero masculino, através de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) combinada com imunistoquímica, verificando uma associação entre microquimerismo endotelial e episódios prévios de rejeição mediada por células T.

2.3.1 *Microquimerismo e doença do enxerto contra o hospedeiro*

O Microquimerismo tem sido demonstrado após transplante de órgãos (como transplante de medula óssea, rins e coração) através da persistente mistura de populações de células do doador e hospedeiro. Acredita-se que as células imunes quiméricas do doador tenham atividade na modulação da resposta imune no hospedeiro. As células do doador podem iniciar não somente a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), mas também possuir um importante papel na indução da tolerância ao tecido enxertado (TRIULZI; NALESNIK, 2001).

Os tecidos, especialmente quando afetados pela DECH, podem conter infiltrados de células hematopoiéticas ou linfóides do doador (TRAN *et al.*, 2003). Como as células T representam a principal população de células mediando a DECH, o monitoramento precoce do quimerismo de células T pode prever a ocorrência de DECH aguda de grau moderado a grave (JAKSCH *et al.*, 2005).

O TCTH realizado a partir de doador do gênero feminino é mais sujeito ao desenvolvimento de DECH, o que pode ser justificado por possível gravidez antes do transplante e devido, provavelmente, ao microquimerismo fetal (VERDIJK *et al.*, 2004), relacionado aos antígenos menores de histocompatibilidade (ADAMS *et al.*, 2003).

Adams *et al.* (2003) relataram a possibilidade de ocorrência de quimerismo de origem materno-fetal, de transfusões de sangue não-irradiadas e de gêmeos, podendo contribuir para o estabelecimento e desenvolvimento de DECH em indivíduos transplantados a partir de doadores homens ou mulheres sem história de gravidez.

A obtenção do quimerismo completo a partir de células do doador é o objetivo principal do TCTH alogênico. A persistência de células hematopoiéticas do receptor

umenta o risco de recorrência da doença primária, uma das maiores razões de mortalidade após TCTH alogênico. Outra razão principal para morbidade e mortalidade é a DECHc extensa, a qual pode ser mais grave quando o quimerismo completo ocorre precocemente no sangue periférico. Portanto, o quimerismo completo precoce pode ser preditivo de desenvolvimento de DECHc grave (BALON *et al.*, 2005).

Tran *et al.* (2003) examinando pacientes submetidos a transplantes de doadores do gênero masculino para receptores do gênero feminino, após quatro a seis anos de transplante, identificaram células da mucosa bucal positivas para cromossomo Y em todas as pacientes, em proporções de 0,8 a 12,7 %, não fazendo qualquer correlação com a gradação clínica ou histológica da DECHc. Os mesmos autores evidenciaram a transdiferenciação de células tronco de medula óssea para células epiteliais bucais, através da técnica de FISH associada à imunoistoquímica.

SPYRIDONIDIS *et al.* (2004) verificaram uma maior presença de células do doador no epitélio danificado de cólon em mulheres submetidas ao TCTH, quando comparadas às áreas com epitélio intacto. Os autores, utilizando-se de técnica de FISH para identificação do cromossomo Y, descartaram a hipótese de transferência horizontal de DNA ou fusão celular, afirmando que o dano tecidual aumentaria a incorporação de células epiteliais de origem do doador, tornando o quimerismo epitelial um fenômeno real após TCTH.

O microquimerismo em TCTH de doador-receptor de gêneros diferentes pode ser avaliado através de PCR ou de FISH para identificação de cromossomos sexuais (BUÑO *et al.*, 2005).

A informação sobre o estágio do quimerismo do paciente é de grande importância na comparação de diferentes regimes de condicionamento e de profilaxia, bem como no estabelecimento do prognóstico após TCTH (GRUBIC *et al.*, 2005).

Metaxas *et al.* (2005) relataram a presença de 1,8% de células epiteliais bucais de origem do doador em raspados de mucosa bucal de 12 de 13 mulheres que receberam transplante de doadores do gênero masculino há 56 a 1964 dias. Os raspados de mucosa bucal foram realizados onde não havia sinais de mucosite ou DECH. As células epiteliais foram identificadas pelas características morfológicas epiteliais, expressão de citoqueratina, positividade para cromossomo Y e negatividade para CD45 (marcador de linhagem sanguínea).

3 OBJETIVO

Investigar a possibilidade da ocorrência de microquimerismo em glândulas salivares labiais de pacientes submetidas ao transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico.

4 METODOLOGIA

Todo o protocolo de pesquisa seguiu a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sendo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (COEP) da UFMG sob o parecer ETIC nº 373/08.

O microquimerismo em GSL de pacientes submetidas ao TCTH foi investigado utilizando-se a avaliação da presença de cromossomo Y em GSL de pacientes do gênero feminino que receberam TCTH com doadores do gênero masculino, tratando-se de um estudo analítico qualitativo com base genética. O cromossomo Y foi escolhido pela facilidade de identificação como de origem do doador, embora o microquimerismo possa ocorrer entre doador e receptor de qualquer gênero.

4.1 *Seleção das amostras*

Foram selecionadas onze amostras de glândulas salivares labiais (GSL) de pacientes submetidos ao TCTH, sendo cinco amostras de pacientes do gênero feminino com doadoras do gênero feminino, cinco amostras de pacientes do gênero feminino com doadores do gênero masculino e uma amostra de paciente do gênero masculino, a partir dos arquivos do laboratório de patologia bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG (LPB-FOUFMG).

Das onze amostras selecionadas, cinco foram destinadas ao grupo estudo (gênero feminino com doador do gênero masculino), cinco para o grupo controle negativo (gênero feminino com doador do gênero feminino) e uma para o controle positivo (gênero masculino). Não houve conhecimento prévio do grau de DECHc de cada

paciente selecionado. Nenhuma das amostras de pacientes do gênero feminino se referia a pacientes com história de gravidez de filhos do gênero masculino.

O grupo estudo foi utilizado em mesmo número ao grupo controle para tentar compensar a impossibilidade de se descartar outras fontes de microquimerismo do cromossomo Y, como a transfusão sanguínea, à qual estes pacientes são submetidos diversas vezes antes e algumas vezes depois do TCTH, bem como o aborto espontâneo, um gêmeo perdido ou relação sexual (DZIK, 1995; BIANCHI *et al.*, 1996; KUROKI *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2005).

4.2 Coleta do material e obtenção dos cortes

As amostras de GSL foram primariamente obtidas através de coleta realizada por biópsia incisional realizada em mucosa de lábio inferior, do lado direito, após anestesia local por bloqueio de campo. As biópsias foram realizadas na clínica do Projeto de extensão em tratamento de pacientes submetidos ao Transplante de Medula Óssea da faculdade de Odontologia da UFMG (Projeto TMO-FOUFMG), conforme solicitação do serviço de TCTH do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), em torno de cem dias após o TCTH, sendo parte do material coletado destinado à classificação do grau de DECHc em mucosa bucal e GSL segundo GOMEZ *et al.* (2001), realizado pela rotina do LPB-FOUFMG. Outra parte das amostras de GSL foi embebida, por 30 minutos, em solução de sacarose 30% a 4°C. Logo após, as amostras foram transferidas para o meio de inclusão Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), acondicionadas em criotubo e imediatamente colocadas em gelo seco. Após aproximadamente 8 horas, as amostras foram transferidas para *freezer* -70°C, onde permaneceram até o processamento.

As amostras dos grupos estudo e controle foram numeradas sequencialmente para que não fossem conhecidos os gêneros dos doadores durante o processo da pesquisa (mascaramento).

Fragmentos de 7 μm de cada amostra foram obtidos no criostato e colocados em lâminas com carga (VWR Scientific, West Chester, PA, USA) e fixados em acetona (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) a 4°C por 10 minutos para coloração histológica e imuofluorescência ou fixados em solução de Carnoy para realização da Hibridização.

4.3 Coloração histológica

Para avaliação da qualidade e preservação do tecido, um fragmento de cada corte obtido em criostato foi submetido à coloração histológica por hematoxilina e eosina, segundo (FARIA *et al.*, 2005, 2009). Os cortes foram submetidos a cinco banhos de água corrente por 3 minutos cada e, posteriormente, foram corados com hematoxilina. Em seguida, as lâminas passaram por um banho de água corrente por 15 minutos e, então, foram corados com eosina. Foi realizada uma seqüência de banhos em álcool 70%, 80% e 85%, e mais três banhos com álcool 95% para que os cortes fossem desidratados. Em seguida, foram submetidas a três banhos de xilol para diafanização, e finalmente, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). À microscopia ótica foi constatado que todas as amostras se apresentavam preservadas e adequadas ao estudo.

4.4 Teste de hibridização “*in situ*” por fluorescência (FISH)

O protocolo para realização da Hibridização *in situ* por fluorescência foi realizado com adaptações ao preconizado pelo fabricante da sonda, bem como ao proposto por Buño *et al.* (2003).

As amostras congeladas de GSL foram submetidas a cortes de 7µm em criostato e colocadas sobre lâminas com carga (VWR Scientific, West Chester, PA, USA), sendo realizadas duas lâminas seqüenciais para cada amostra, uma para hibridização *in situ* e uma para imunofluorescência. Em cada lâmina foram colocados três cortes de cada amostra.

As amostras destinadas à hibridização *in situ* (1 lâmina de cada) foram fixadas em solução de Carnoy (metanol:ácido acético = 3:1 por volume) por duas vezes de 5 minutos cada. As lâminas foram então levadas ao termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient 5331; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) com adaptador para Hibridização *in situ* (*In situ* adapter, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) por 20 minutos a 90°C; sendo então lavadas em 2X SSC (Solução de Citrato de Sódio Salino) a 37°C; desidratadas por cadeia crescente de etanol (70%, 85% e 100% por 1 minuto cada) e secas à temperatura ambiente. As amostras receberam então tratamento com 50µl de solução de pepsina (Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA) 0,005% em HCl 0,01N a 37°C por 1 hora. Foram novamente desidratadas por cadeia crescente de etanol (70%, 85% e 100% por 1 minuto cada) e deixadas no álcool 100% até receber a solução da sonda para cromossomo Y. A solução da sonda foi preparada em um tubo contendo 0,5µl da sonda Vysis CEP Y Satellite III Spectrum Green (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA), 3,5µl de buffer Vysis CEP Hybridization Buffer (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) e 1µl de água Milli-Q para cada lâmina,

submetido à centrifugação por 1 a 3 segundos, ao vortex, e novamente centrifugado por 1 a 3 segundos, sendo colocado em banho maria por cinco minutos a 73°C. O tubo com a solução da sonda e as lâminas foram mantidos na incubadora a 48°C. Em cada lâmina contendo três cortes foram escolhidos os dois melhores cortes e o terceiro descartado. No corte mais próximo à identificação de cada lâmina foi adicionado 5 µl de SSC 2X (para servir como controle negativo interno) e no mais distante 5µl da solução da sonda, sendo cobertas com lamínulas, seladas com esmalte e levadas ao termociclador com adaptador para lâminas por 5 minutos a 75°C (desnaturação), com temperatura baixando até 48°C. As amostras foram então incubadas overnight (16h) em câmara úmida a 42°C.

As lamínulas foram removidas das lâminas através da remoção do esmalte; sendo as lâminas submetidas a tratamento por 2 minutos em solução de 0,4X SSC/0,3% NP-40 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 75°C; submetidas a tratamento por 1 minuto em solução de 0,1% NP-40/ 2X SSC à temperatura ambiente, sem secar; e recebendo 6 µl de DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride – Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 1:300 diluída em PBS-BSA 2% à temperatura ambiente por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas por duas vezes em 1X PBS à temperatura ambiente, secadas em torno dos cortes com papel filtro, e montadas com Hydromount (National Diagnostics Inc., Atlanta, GA, USA) à temperatura ambiente.

Observação: todas as fases a partir da diluição da sonda foram realizadas ao abrigo da luz.

4.5 Reações de imunofluorescência

As reações de imunofluorescência seguiram o protocolo descrito por Faria *et al.* (2005, 2009). As lâminas sequenciais obtidas por corte em criostato foram submetidas à

imunofluorescência com citoqueratina para definição da natureza epitelial das células com microquimerismo do cromossomo Y, sendo realizada uma sequência de cinco banhos de 3 minutos cada em PBS 1X (para remoção do Tissue-tek); sendo retirado o excesso de PBS com papel filtro, tomando-se cuidado para não danificar os cortes e não secá-los por completo. As lâminas com as amostras foram então fixadas com acetona gelada (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 10 minutos; seguidas de cinco lavagens de 3 minutos cada em PBS 1X à temperatura ambiente; incubadas com PBS/BSA 2% durante 40 minutos à temperatura ambiente (para redução das marcações inespecíficas), sendo então incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anticitoqueratina humana AE1/AE3 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) 1:40 *overnight*.

As amostras foram então submetidas a cinco banhos em PBS 1X de 3 minutos cada à temperatura ambiente. Para reduzir as marcações inespecíficas os cortes foram incubados com PBS-BSA durante 30 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (anti-camundongo Texas Red) 50 μ l da solução (2,5 μ l anticorpo/250 μ l de PBS-BSA) por 50 minutos. As lâminas foram lavadas em cinco banhos de PBS 1X por 3 minutos cada, à temperatura ambiente; acrescidas de 30 μ l de DAPI 1:300 diluída em PBS-BSA 2% à temperatura ambiente por 10 minutos e submetidas cinco banhos em PBS 1X por três minutos à temperatura ambiente. Foi realizada a secagem do excesso de PBS em torno dos cortes com papel filtro e montagem das lâminas com Hydromount (National Diagnostics Inc., Atlanta, GA, USA) à temperatura ambiente. No experimento também foi utilizado um corte da lâmina sem anticorpo primário, mas com adição do secundário, para verificação de possível marcação inespecífica.

As lâminas foram acondicionadas em recipientes próprios para abrigo da luz (Pop-up slide holder, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) e submetidas à análise em microscopia confocal.

4.6 *Microscopia confocal*

As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Zeiss 1024 laser *scanning confocal*) utilizando o programa LSMix acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 100) com objetiva de imersão em óleo (60X, 1.2 NA). Os lasers UV (488nm) ou laser criptônio/argônio foram usados para excitar as preparações (através das linhas de 363 nm, 488 nm ou 543 nm), e a luz emitida foi selecionada utilizando-se filtros (505/30 para FITC e LP560 para PE). Também foi realizada a série Z, com o objetivo de se verificar a localização nuclear da marcação.

O processamento e análise das imagens foram realizados utilizando-se os programas LSMix, *Adobe Photoshop 7.0* e *Image Tool*. As imagens foram digitalizadas e armazenadas em DVD para análise posterior, sendo adquiridos cinco campos em microscopia confocal para cada corte, utilizando-se comprimentos de onda específicos para FITC, PE e DAPI (as imagens adquiridas do DAPI foram realizadas utilizando uma lâmpada de mercúrio).

4.7 *Análise das imagens*

Foram consideradas como positivas para cromossomo Y em GSL as marcações nucleares ou perinucleares, conforme resultados dos estudos de Kuroki *et al.* (2002), Buño *et al.* (2005), Metaxas *et al.* (2005) e Ferlicot *et al.* (2010). A natureza epitelial

das células positivas para cromossomo Y foi verificada a partir da marcação com citoqueratina AE1/AE3.

4.8 Coletas de dados dos pacientes analisados

Os dados dos pacientes selecionados para o estudo foram obtidos dos prontuários do Projeto TMO-FOUFMG e do Serviço de TMO HC-UFMG, sendo coletados os seguintes: doença primária, tipo de transplante, gradação histológica de DECHc de GSL, gênero do doador, data do transplante e idade do paciente na época do transplante. O paciente utilizado como controle positivo teve como doença primária a Anemia Aplásica, tipo de transplante medula óssea doada pela irmã, DECHc leve e 38 anos de idade. O QUADRO 4 exhibe os dados coletados das pacientes estudadas.

QUADRO 4

**Pacientes do gênero feminino estudadas, doença primária, tipo de TMO,
estágio de DECHc, gênero do doador e idade dos pacientes.**

Amostra n°	Doença Primária	Tipo de TMO	DECHc	Doador	Idade
1	AA	MO	Ausente	Irmã	26
2	LMC	CTP	Moderado	Irmã	51
3	LMC	CTP	Leve	Irmão	46
4	LMC	MO	Leve	Irmão	53
5	LMA	CTP	Ausente	Irmã	16
6	LMC	MO	Leve	Irmã	26
7	LMA	CTP	Ausente	Irmão	44
8	LMA	CTP	Leve	Irmã	25
9	LMC	MO	Leve	Irmão	40
10	LMC	CTP	Ausente	Irmão	56

LMC – Leucemia Mielóide Crônica; LMA – Leucemia Mielóide Aguda; AA – Anemia Aplásica; CTP – Células Tronco Periféricas; MO – Medula Óssea

5 RESULTADOS

Os ensaios laboratoriais nos permitiram verificar marcação positiva para cromossomo Y no controle positivo realizado com paciente do gênero masculino, marcação positiva para cromossomo Y em todas as amostras do grupo estudo (100%). Não houve marcação positiva evidente no grupo controle negativo. A marcação com citoqueratina ocorreu por toda a extensão de glândulas e ductos de todas as amostras estudadas, evidenciando a natureza epitelial dos tecidos utilizados.

O QUADRO 5 reúne os resultados observados nas amostras das pacientes estudadas, enquanto as FIGURAS 1 a 8 ilustram os mesmos resultados.

QUADRO 5

Pacientes estudadas, marcação para microquimerismo do cromossomo Y e para citoqueratina AE1/AE3, classificação da DECHc e gênero do doador.

TMO n°	Cromossomo Y	Citoqueratina AE1/AE3	DECHc	Doador
1	-	+	Ausente	Irmã
2	-	+	Moderado	Irmã
3	+	+	Leve	Irmão
4	+	+	Leve	Irmão
5	-	+	Ausente	Irmã
6	-	+	Leve	Irmã
7	+	+	Ausente	Irmão
8	-	+	Leve	Irmã
9	+	+	Leve	Irmão
10	+	+	Ausente	Irmão

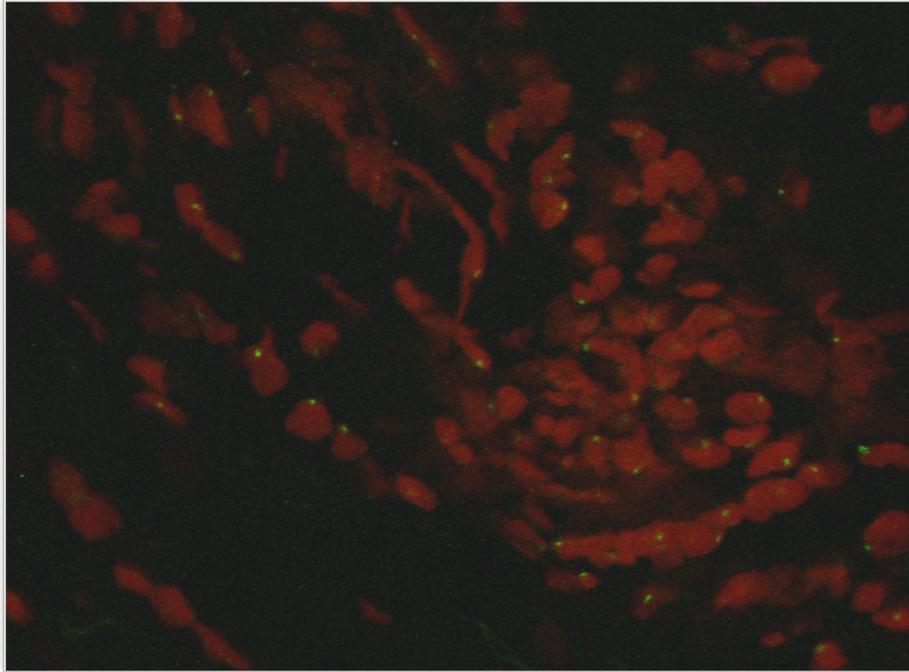


FIGURA 1 – Controle positivo evidenciando positividade de marcação para cromossomo Y (pontos verdes no núcleo em vermelho).

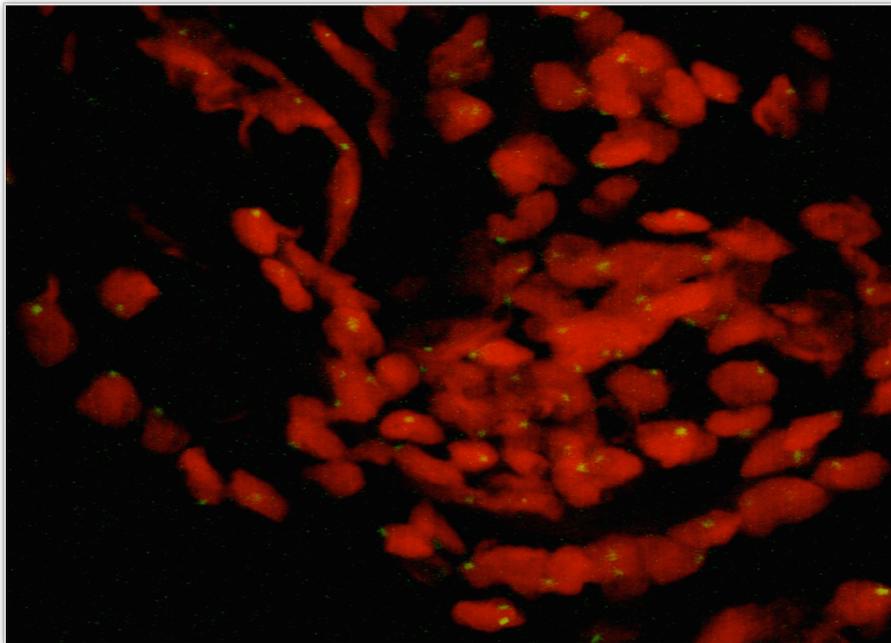


FIGURA 2 – Série Z da amostra anterior, evidenciando localização nuclear ou perinuclear do cromossomo Y (verde no núcleo em vermelho).

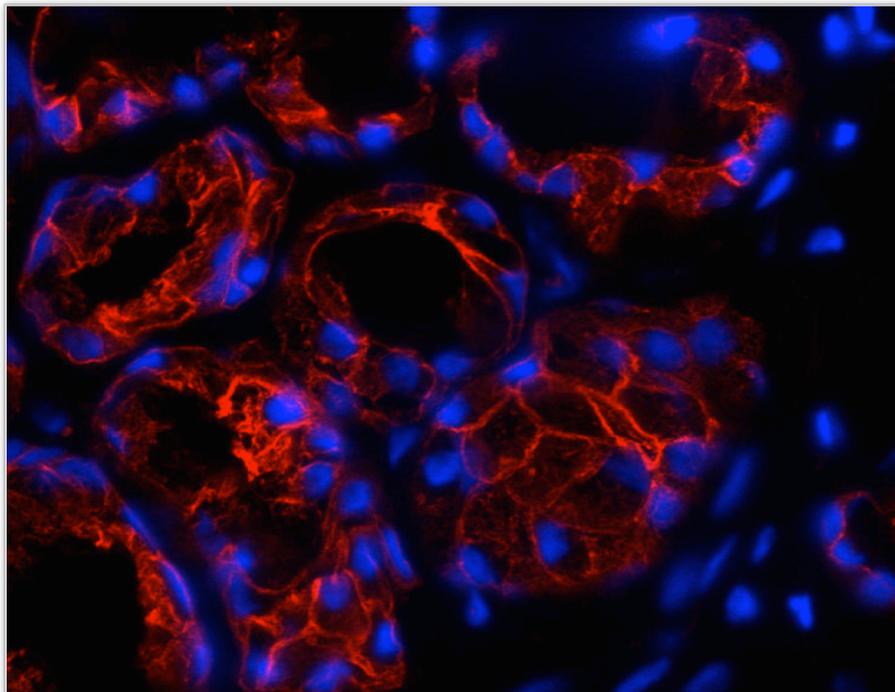


FIGURA 3 – Imunofluorescência para Citoqueratina AE1/AE3 para evidenciar a natureza epitelial das células da amostra anterior (Citoqueratina em vermelho e núcleos contracorados com DAPI em azul).

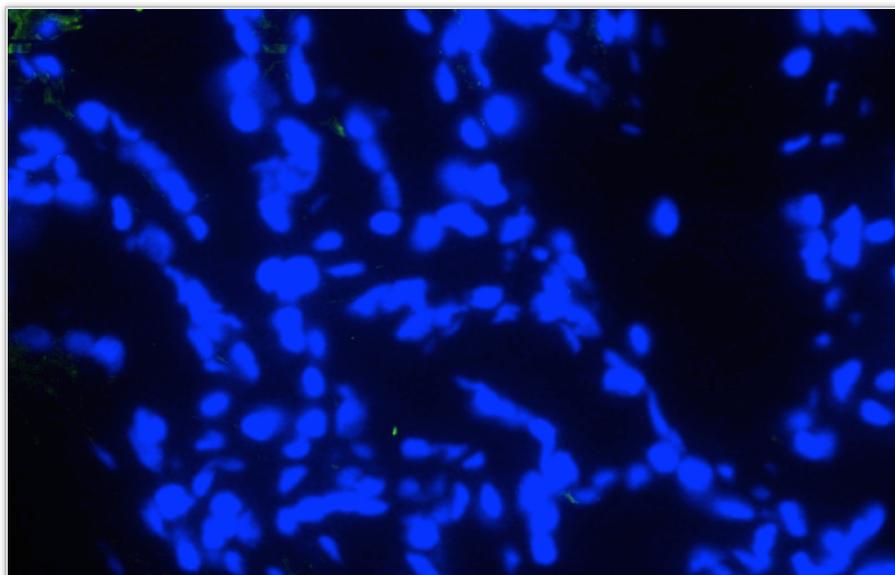


FIGURA 4 – Controle masculino sem sonda com grande aumento de captação do sinal sem marcação positiva.

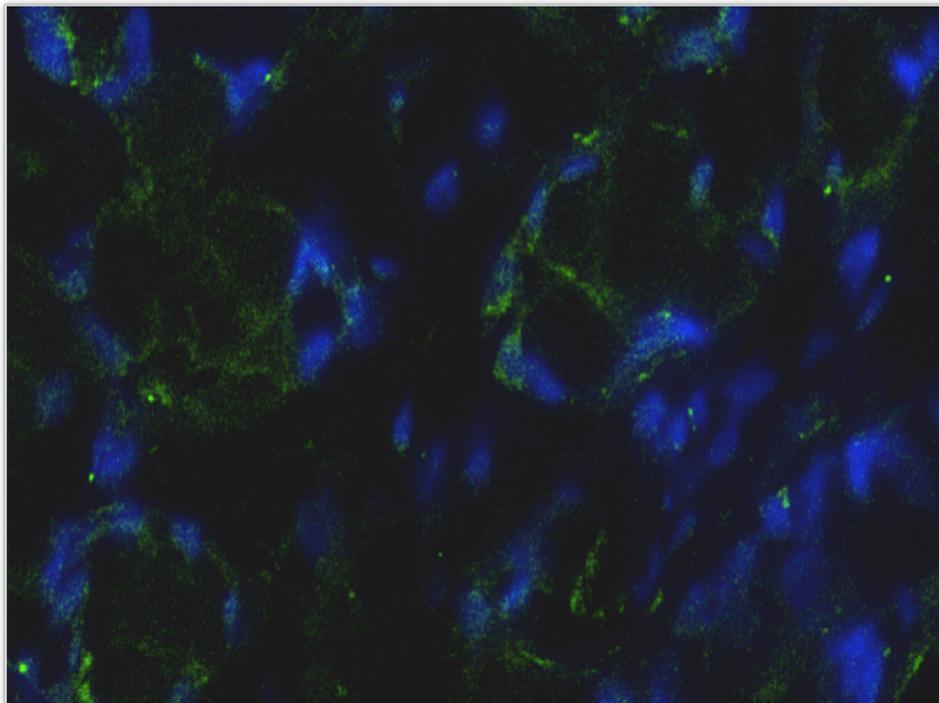


FIGURA 5 – Marcação positiva para cromossomo Y (pontos verdes) em alguns núcleos da amostra número 3.

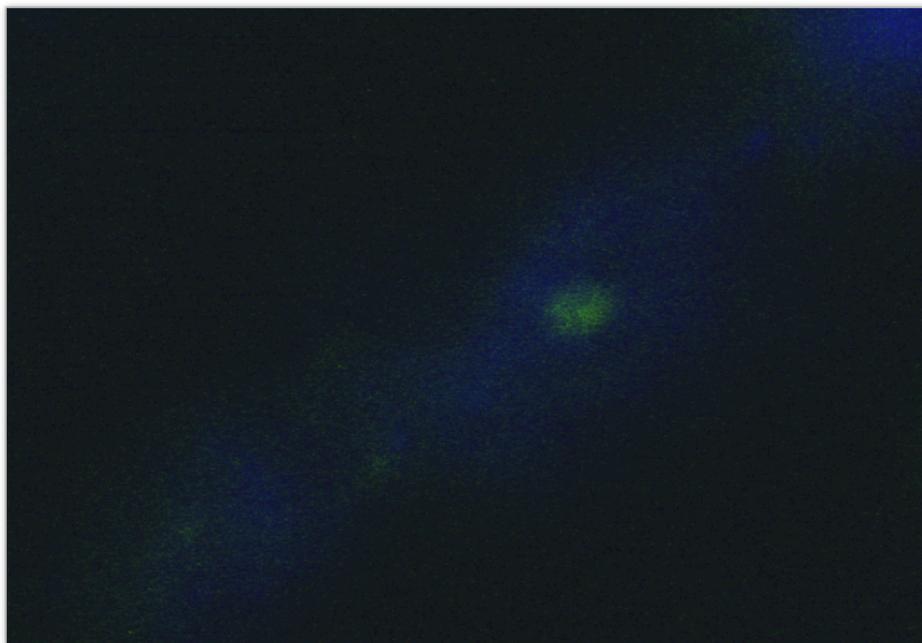


FIGURA 6 – Série Z (detalhe) da amostra anterior evidenciando marcação para cromossomo Y (verde) no núcleo em azul.

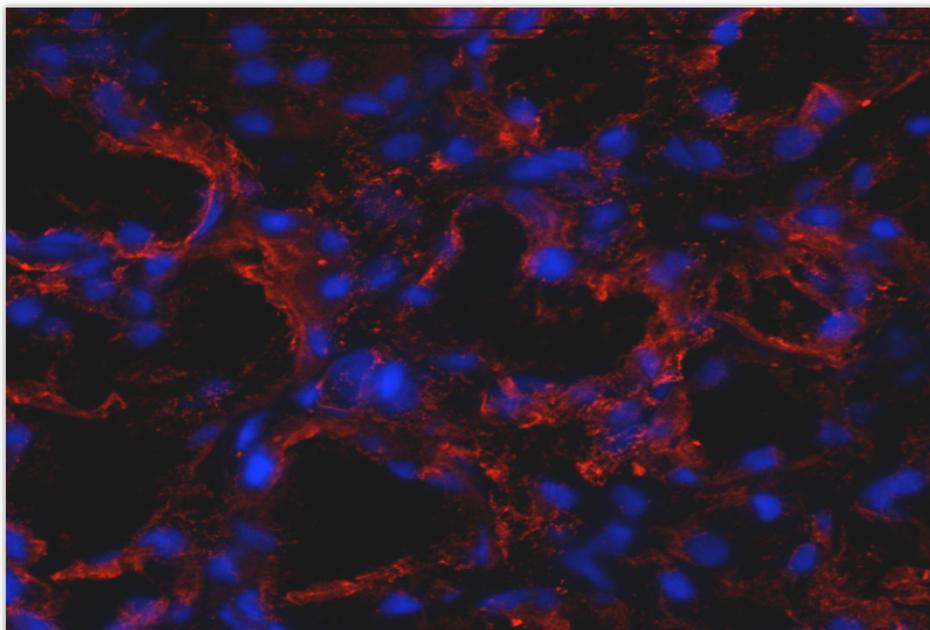


FIGURA 7 – Marcação positiva da amostra anterior para Citoqueratina AE1/AE3 (em vermelho).

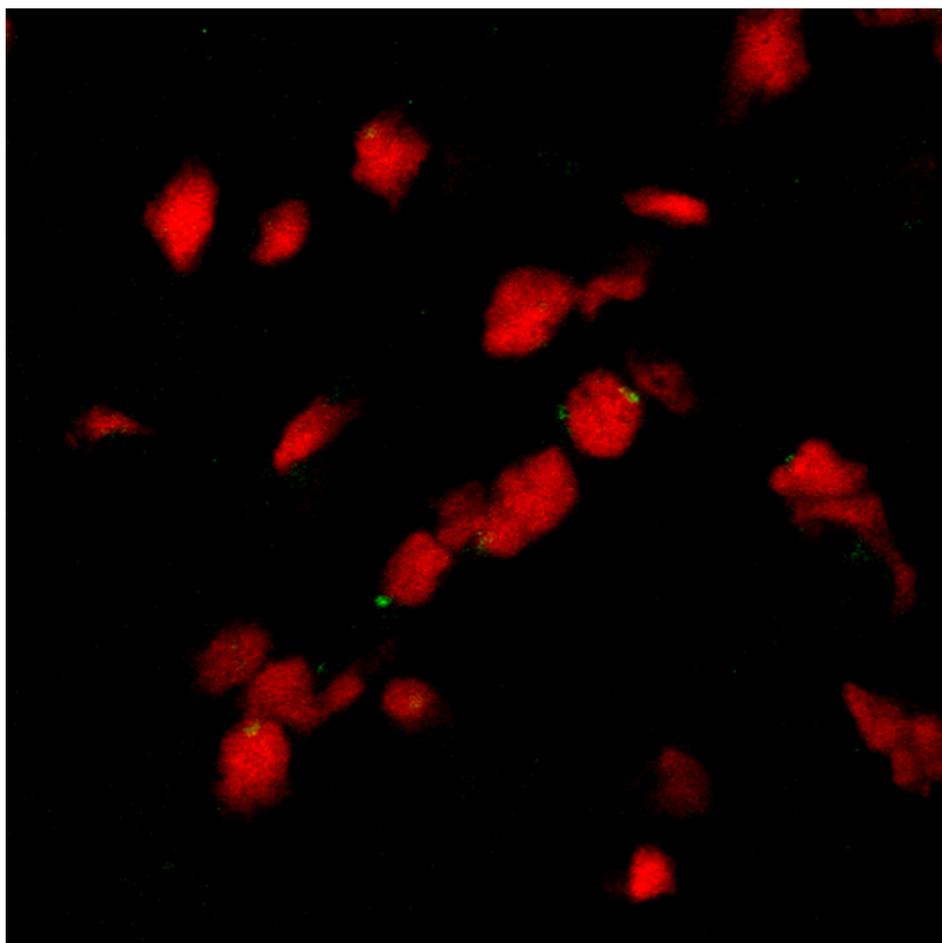


FIGURA 8 – Série Z da amostra número 4 evidenciando marcação positiva para o cromossomo Y (verde) em alguns núcleos (vermelho).

6 DISCUSSÃO

A avaliação do microquimerismo em pacientes submetidos ao TCTH alogênico pode ser realizado por meio de duas técnicas com resultados semelhantes, a de FISH e a de PCR (BUÑO *et al.*, 2005; ROUTLEDGE *et al.*, 2007). No entanto, a utilização da técnica de Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para avaliação do microquimerismo do cromossomo Y foi apropriada, uma vez que a técnica tem como características a baixa frequência de falsos positivos, a grande disponibilidade de células e a alta sensibilidade (BADER *et al.*, 2005), sendo que o único ponto negativo seria a restrição do seu uso para avaliação de transplantes entre gêneros diferentes (ROUTLEDGE *et al.*, 2007). Além disso, é atualmente o método mais usado para medida do quimerismo em TCTH alogênico entre indivíduos de gêneros diferentes (LIESVELD; ROTHBERG, 2008), tendo sido relatado para esta finalidade por vários autores e correspondendo ao objetivo do presente trabalho (DÍEZ-MARTÍN *et al.*, 1998; TRAN *et al.*, 2003; BUÑO *et al.*, 2003; SPYRIDONIDIS *et al.*, 2004; BORUE *et al.*, 2004; BUÑO *et al.*, 2005; METAXAS *et al.*, 2005). Entretanto, esta técnica ainda não foi usada para avaliar microquimerismo em glândulas salivares labiais (GSL) de pacientes submetidos ao TCTH, mas já foi utilizada nas mesmas glândulas para avaliação de doenças auto-imunes (ENDO *et al.*, 2002; ARACTINGI *et al.*, 2002; KUROKI *et al.*, 2002; MOSCA *et al.*, 2003).

O microquimerismo do cromossomo Y, identificado no grupo estudo no núcleo das células epiteliais glandulares, pode ser verificado por FISH e pelas reações de imunofluorescência para citoqueratina AE1/AE3. As células microquiméricas não representariam a fusão celular como demonstrado em estudos *in vitro* (TERADA *et al.*, 2002; YING *et al.*, 2002), mas possivelmente a transdiferenciação das células

pluripotenciais do doador em tecido epitelial glandular no receptor como mostrado em estudos *in vivo* (TRAN *et al.*, 2003; SPYRIDONIDIS *et al.*, 2004; BRITTAN *et al.*, 2005; METAXAS *et al.*, 2005). Entretanto, outras fontes de microquimerismo foram minimizadas através do pareamento dos grupos controle e estudo, mas não poderiam ser totalmente excluídas (DZIK, 1995; BIANCHI *et al.*, 1996; KUROKI *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2005).

Todas as cinco amostras do grupo estudo foram positivas para a presença de microquimerismo do cromossomo Y, sendo que três destas amostras apresentavam DECHc leve e duas ausente. A presença do cromossomo Y nas amostras classificadas como DECHc ausente poderia preceder o desenvolvimento de fibrose dos ácinos (SAWAYA *et al.*, 2004; SPYRIDONIDIS *et al.*, 2004; OGAWA *et al.*, 2005), uma vez que o dano tecidual aumenta a possibilidade de microquimerismo de células epiteliais (BORUE *et al.*, 2004; SPYRIDONIDIS *et al.*, 2004). Como todas as amostras estudadas são coletadas por volta de cem dias de transplante, o padrão em relação ao tempo estaria mantido, entretanto a DECH poderia se manifestar antes, durante ou após este período (FILIPOVICH *et al.*, 2005).

A seleção aleatória das amostras quanto ao grau de DECHc, bem como o número das mesmas não permitiram a verificação da possível relação da mesma com o microquimerismo do cromossomo Y. Além disso, apesar da constatação de que o microquimerismo do cromossomo Y estaria presente nas GSL das pacientes que receberam TCTH de doadores do gênero masculino, não foi possível saber, assim como em vários estudos, se a presença do cromossomo Y seria determinante para o estabelecimento da alteração ou se estaria relacionada à presença do mesmo em tecidos danificados em processo de regeneração (SPYRIDONIDIS *et al.*, 2004; BORUE *et al.*, 2004; DUBERNARD *et al.*, 2008, 2009; GADI, 2010).

7 CONCLUSÕES

O microquimerismo do cromossomo Y nas glândulas salivares labiais de pacientes submetidas ao TCTH é um fenômeno real. Novos estudos são necessários para se verificar o impacto deste fenômeno na evolução dos pacientes transplantados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ADAMS, K.M., LAMBERT, N.C., HEIMFELD, S., TYLEE, T.S., PANG, J.M., ERICKSON, T.D., NELSON, J.L. Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood*, v.102, n.10, 2003.
- 2 AMOS, T.A., GORDON, M.Y. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation – a review. *Cell Transplant.*, v.4, p.547-569, 1995.
- 3 ANDO, T., DAVIES, T.F. Postpartum Autoimmune thyroid disease: the potential role of fetal microchimerism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 88, p.7, p.2965-2971, 2003.
- 4 APPLEBAUM, F.R. Marrow transplantation for hematologic malignances: a brief review of current status and future prospects. *Sem. Hemathol.*, v.25, Suppl. 3, p.16-22, 1988.
- 5 ATKINSON, K. Chronic graft-versus-host disease – review. *Bone Marrow Transplant.*, v.5, p.69-82, 1990.
- 6 BADER, P., NIETHAMMER, D., WILLASCH, A., KREYENBERG, H., KLINGEBIEL, T. How and When should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.*, v. 35, p. 107-119, 2005.
- 7 BALON, J., HALABURDA, K., BIENIASZEWSKA, M., REICHERT, M., BIENIASZEWSKI, L., PIEKARSKA, A. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*, v. 35, p. 1083-1088, 2005.

- 8 BANDINI, G., BELARDINELLI, A., ROSTI, G. CALORI, E. MOTTA, M.R., RIZZI, S., BENINI, C. TURA, S. Toxicity of high-dose bussulphan and ciclophosphamide as conditioning therapy for allogeneic bone marrow transplantation in adults with haematological malignances. *Bone Marrow Transplant.*, v.13, p.577-581, 1994.
- 9 BARNES, D.W.H., CORP, M.J., LOUTIT, J.F. Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow: preliminary communication. *Br. Med. J.*, v.2, p.626-627, 1956.
- 10 BARRETT, A.P., BILOUS, A.M. Oral patterns of acute and chronic graft-v-host disease. *Arch. Dermatol.*, v.120, p.1461-1465, 1984.
- 11 BASARA, N., BLAU, I.W., WILLEBACHER, W., KIEHL, M.G., FAUSER, A.A. New strategies in the treatment of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*, v. 25, Sup.2, p. S12-S15, 2000.
- 12 BIANCHI, D.W., ZICKWOLF, G.K., WEIL, G.J., SYLVESTER, S., DeMARIA M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post partum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 705-708, 1996.
- 13 BILLINGHAM, R.E. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.*, v.62, p.21, 1966-67.
- 14 BOMBI, J.A., PALOU, J., BRUGUERA, M., FELIU, E., MARTIN-ORTEGA, E., ROZMAN, C., CARDESA, A. Pathology of bone marrow transplantation. *Semin. in Diagn. Pathol.*, v.9, n.3, p.220-231, 1992.
- 15 BORTIN, M.M. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*, v.9, n.6, p.571-587, 1970.
- 16 BORTIN, M.M. Key results from recent analysis: a report from the

- international bone marrow transplant registry. *Exp. Hematol.*, v.16, p.414, 1988.
- 17 BORUE, X.; LEE, S.; GROVE, J.; HERZOG, E.L.; HARRIS, R.; DIFLO, T.; GLUSAC, E.; HYMAN, K.; THEISE, N.D.; KRAUSE, DS. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am. J. Transplant.*, v. 165, n.5, p.1767-1772, 2004.
- 18 BRITTAN, M.; BRAUN, K.M.; REYNOLDS, L.E.; POULSOM, R.; ALISON, M.R.; WRIGHT, N.A.; HODIVALA-DILKE, K.M. Bone marrow cells engraft within epidermis and proliferate *in vivo* with no evidence of cell fusion. *J Pathol.* v. 205, p.1-13, 2005.
- 19 BUÑO, I., ANTA, B., MORENO-LÓPEZ, E., BALSALOBRE, P., BALAS, A., GARCÍA-SANCHÉZ, F., SERRANO, D., CARRIÓN, R., GÓMEZ-PINEDA, A., DÍEZ-MARTÍN, J.L. Lineage-specific chimerism quantification after T-cell depleted peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia Lymphoma*, v.44, p. 659-667, 2003.
- 20 BUÑO, I., NAVA, P., SIMÓN, A., GONZÁLEZ-RIVERA, M., JIMÉNEZ, J.L., BALSALOBRE, P., SERRANO, D., CARRIÓN, R., GÓMEZ-PINEDA, A., DÍEZ-MARTÍN, J.L. A comparison of fluorescent *in situ* hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Hematologica*, v. 90, n. 10, p. 1373-1379, 2005.
- 21 CARLENS, S., RINGDEN, O., REMBERG, M., LÖNNQVIST, B., HÄGGLUND, H., KLAESSON, S., MATTSSON, J., SVAHN, B-M., WINIARSKI, J., LJUNGMAN, P., ASCHAN, J. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective

- single centre analysis. *Bone Marrow Transplant.*, v.22, p.755-761, 1998.
- 22 COHEN, S.B.A., WANG, X.N., DICKINSON, A. Can cord blood cells support the cytokine storm in GVHD? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.11, p.185-197, 2000.
- 23 CORRÊA, M.E.P. A mucosa oral e glândulas salivares acessórias na doença do enxerto contra o hospedeiro crônica pós transplante de medula óssea: estudo prospectivo dos primeiros 63 transplantados de medula óssea; análise comparativa com parâmetros clínicos e biópsia de pele. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1999. 106 p. (Dissertação, Mestrado em Anatomia Patológica, Anatomia Patológica).
- 24 CURTIS, J.W., CAUGHMAN, G.B. An apparent relationship between rampant caries and the oral mucosal manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.78, n.2, p.267-272, 1994.
- 25 DAHLLÖF, G., HEIMDAHL, A., BOLME, P., LONNEQVIST, B., RINGDÉN, O. Oral conditions in children treated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.3, p.43-45, 1988.
- 26 DAHLLÖF, G., HEIMDAHL, A., MODÉER, T., TWETMAN, S., BOLME, P., RINGDÉN, O. Oral mucous membrane lesions in children treated with bone marrow transplantation. *Scand. J. Dent. Res.*, v.97, n.3, p.268-277, 1989.
- 27 DÍEZ-MARTÍN, J.L., LLAMAS, P., GOSÁLVEZ, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., POLO, N., DE LA FUENTE, M.S., BUÑO, I. Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leukocyte infusion (DLI). *Haematologica*, v. 83, p. 408-415, 1998.

- 28 DUBERNARD, G., ARACTINGI, S., OSTER, M., ROUZIER, R., MATHIEU, M-C., UZAN, S., KHOSROTEHRANI, K. Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.*, v. 10, n. 1, p. R14, 2008.
- 29 DUBERNARD, G., OSTER, M., CHAREYRE, F., ANTOINE, M., ROUZIER, R., UZAN, S., ARACTINGI, S., KHOSROTEHRANI, K. Increased fetal cell microchimerism in high grade breast carcinomas occurring during pregnancy. *Int. J. Cancer*, v. 124, p. 1054-1059, 2009.
- 30 DZIK, W.H. Microchimerism after transfusion: the spectrum from GVHD to alloimmunization. *Transfus. Sci.*, v.16, n.2, p. 107-108, 1995.
- 31 ENDO, Y., NEGISHI, I., ISHIKAWA, O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology*, v.41, p. 490-495, 2002.
- 32 FARIA, D.R., GOLLOB, K.J., BAROBOSA, Jr., J., SCHRIEFER, A., MACHADO, P.R.L., LESSA, H., CARVALHO, L.P., ROMANO-SILVA, M.A., DE JESUS, A.R., CARVALHO, E.M., DUTRA, W.O. Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v.73, n.12, p. 7853-7859, 2005.
- 33 FARIA, D.R., SOUZA, P.E.A., DURÃES, F.V., CARVALHO, E.M., GOLLOB, K.J., MACHADO, P.R., DUTRA, W.O. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immun.* V. 31, n. 8, p. 432-439, 2009.
- 34 FERLICOT, S., VERNOCHET, A., ROMANA, S., ORTIN-SERRANO, M.,

- LETIERCE, A., BRÉGERIE, O., DURRBACH, A., GUETTIER, C. Microchimerism in renal allografts: clinicopathological associations according to the type of chimeric cells. *Histopathology*, v. 56, p. 188-197, 2010.
- 35 FILIPOVICH, A.H., WEISDORF, D., PAVLETIC, S., SOCIE, G., WINGARD, J.R., LEE, S.J., MARTIN, P., CHIEN, J., PRZEPIORKA, D., COURIEL, D., COWEN, E.W., DINNDORF, P., FARRELL, A., HARTZMAN, R. HENSLEE-DOWNEY, J., JACOBSON, D., McDONALD, G., MITTLEMAN, B., RIZZO, J.D., ROBINSON, M., SCHUBERT, M., SCHULTZ, K., SHULMAN, H., TURNER, M., VOGELSANG, G., FLOWERS, M.E.D. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, v. 11, p. 945-956, 2005.
- 36 FREEDMAN, S.E. An overview of bone marrow transplantation. *Sem. Oncol. Nursing*, v.4, p.3-8, 1988.
- 37 FUJII, H., OHASHI, M., NAGURA, H. Immunohistochemical analysis of oral lichen-planus-like eruption in graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.89, n.2, p.177-186, 1988.
- 38 FUJIWARA, K., SUGIURA, J., SAKAI, Y. Electron microscopic studies of early cellular events occurring in oral mucosa of rats affected by graft-versus-host disease (GVHD). *J. Oral Pathol. Med.*, v.26, p.90-92, 1997.
- 39 GADI, V.K. Fetal microchimerism in breast from women with and without breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 121, p. 241-244, 2010.

- 40 GHALIE, R., FITZSIMMONS, W.E, WEINSTEIN, A., MANSON, S., KAIZER, H. Cyclosporine monitoring improves graft-versus-host disease prophylaxis after bone marrow transplantation. *Ann. Pharmacother.*, v.28, n.3, p.379-383, 1994.
- 41 GOMEZ, R.S., CARNEIRO, M.A., SOUZA, L.N., VICTÓRIA, J.M.N., AZEVEDO, W.M., De MARCO, L., KALAPOTHAKIS, E. Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 91, p. 552-556, 2001.
- 42 GOMEZ, R.S., PIMENTA, F.J.G.S., GUIMARÃES, A.L.S., SALOMÃO, U.E., DE ALMEIDA, H.C., VAZ, R.R. Effect of bone marrow transplantation on the immunolocalization of p53, hMSH2, and hMLH1 proteins on oral mucosa. *Oral Diseases*, v.10, p. 207-211, 2004.
- 43 GRATWOHL, A.A., MOTSOPOULOS, H.M., CHUSED, T.M., AKISUKI, M., WOLF, R.O., SWEET, J.B., DEISSEROTH, A.B. Sjögren-type syndrome after allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Internal Med.*, v.87, p.703-706, 1977.
- 44 GRUBIC, Z., STINGL, K., CECUK, J.E., ZUNEC, R., KASTELAN, A. *et al.* Repetitive DNA polymorphisms in following chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Transplant.*, v. 19, p. 586-590, 2005.
- 45 HAYASHIDA, M., NISHIMOTO, Y., MATSUURA, T., TAKAHASHI, Y., KOHASHI, K., SOUZAKI, R., TAGUCHI, T. The evidence of maternal microchimerism in biliary atresia using fluorescent in situ hybridization. *J. Pediat. Surg.*, v. 42, p. 2097-2101, 2007.
- 46 HIROKI, A., NAKAMURA, S., SHINOHARA, M., OKA, M. Significance of oral examination in chronic graft-versus-host disease. *J. Oral Pathol.*

- Med.*, v.23, p.209-215, 1994.
- 47 HORN, T.D. The significance of oral mucosal and salivary gland pathology after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch. Dermatol.*, v.131, n.8, p.964-965, 1995.
- 48 ICHIKAWA, N., KOTAKE, S., HAKODA, M., KAMATANI, N. Microchimerism in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, v. 44, p. 1226-1228, 2001.
- 49 IMANGULI, M.M., ALEVIZOS, I., BROWN, R., PAVLETIC, S.Z., ATKINSON, J.C. Oral graft-versus-host disease. *Oral Diseases*, v.14, p. 396-412, 2008.
- 50 JACEWICZ, R., LEWANDOWISK, K., RUPA-MATYSEK, J., JEDRZEJCZY, M., BRZEZINSKI, P.M., DOBOSZ, T., JONKISZ, A., SZRAM, S., KOMARNICKI, M., BERENT, J. *Bone Marrow Transplant.*, 2010 Feb 22. [Epub ahead of print] doi:10.1038/bmt.2010.27
- 51 JACOBSON, L.O., MARKS, E.K., GASTON, E.D. Effect of splen protection on mortality following x-irradiation. *J. Lab. Clin. Med.*, v.34, p.1538, 1949.
- 52 JAKSCH, M., UZUNEL, M., REMBERGER, M., SUNDBERG, B., MATTSSON, J. Molecular monitoring of T-cell chimerism early after allogeneic stem cell transplantation may predict the occurrence of acute GVHD grades II-IV. *Clin Transplant.*, v.19, p.346-349, 2005.
- 53 KLINTSCHAR, M., SCHWAIGER, P., MANNWEILLER, S., REGAUER, S., KLEIBER, M. Evidence of Fetal Microchimerism in Hashimoto's Thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v. 86, n. 6, p. 2494-2498, 2001.
- 54 KOLBINSON, D.A, SCHUBERT, M.M., FLOURNOY, N., TRUELOVE,

- E.L. Early oral changes following bone marrow transplantation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.66, n.1, p.130-138, 1988.
- 55 KUROKI, M., OKAYAMA, A., NAKAMURA, S., SASAKI, T., MURAI, K., SHIBA, R., SHINOHARA, M. Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 61, p. 1041-1046, 2002.
- 56 LAMBERT, N., NELSON, J.L. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmunity Reviews*, v. 2, p. 133-139, 2003.
- 57 LAWLEY, T.J., PECK, G.L., MOUTSOPOULOS, H.M., GRATWOHL, A.A., DEISSEROT, A.B. Scleroderma Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann. Internal Med.*, v.87, p.707-709, 1977.
- 58 LEVY, S., NAGLER, A., OKON, S., MARMARY, Y. Parotid salivary gland dysfunction in chronic graft-versus-host disease (cGVHD): a longitudinal study in a mouse model. *Bone Marrow Transplant.*, v.25, n.10, p.1073-1077, 2000.
- 59 LIESVELD, J.L., ROTHBERG, P.G. Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.*, v. 42, p. 297-310, 2008.
- 60 LISHNER, M., PATTERSON, B., KANDEL, R., FYLES, G., CURTIS, J.E., MEHARCHAND, J., MINDEN, M.D., MESSNER, H.A. Cutaneous and mucosal neoplasms in bone marrow transplant recipients. *Cancer*, v.65, n.3, p.473-476, 1990.
- 61 LOMBARDI, T., PHILLIPPEAU, M.M., HADENGUE, A., SANSON, J., BORICH, B., RUBBIA-BRANDT, L. Absence of leukocyte microchimerism in oral lichen planus (OLP): an *in situ* hybridization study. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 30, p. 398-401, 2001.

- 62 MARIA, O.M., KHOSRAVI, R., MEZEY, E., TRAN, S.D. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Diseases*, v. 13, p. 11-16, 2007.
- 63 MATTSON, T., HEIMDAHL, A., DAHLLÖF, G., LÖNNQVIST, B., RINGDÉN, O. Oral and nutritional status in allogeneic marrow recipients treated with T-cell depletion or cyclosporine combined with methotrexate to prevent graft-versus-host disease. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.74, n.1, p.34-40, 1992.
- 64 MEDINA, J.E., FRAME, R., TOTH, B., NGUYEN, L.U., LUNA, M.A. Head and neck manifestations of the chronic graft vs host disease. *Laryngoscope*, v.94, p.1145-1151, 1984.
- 65 METAXAS, Y., ZEISER, R., SCHMITT-GRAEFF, A., WATERHOUSE, M., FABER, P., FOLLO, M., BERTZ, H., FINKE, J., SPYRIDONIDIS, A. Human hematopoietic cell transplantation results in generation of donor-derived epithelial cells. *Leukemia*, v.19, p. 1287-1289, 2005.
- 66 MICKELSON, D.M., SPROAT, L., DEAN, R. SOBECKS, R., RYBICKI, L., KALACYO, M., POHLMAN, B., SWEETENHAM, J., ANDRESEN, S., BOLWELL, B. COPELAN, E.A. Comparision of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2010 Mar 22. [Epub ahead of print] doi:10.1038/bmt.2010.55
- 67 MOSCA, M., CURCIO, M., LAPI, S., VALENTINI, G., D'ANGELO, S., RIZZO, G., BOMBARDIERI, S. Correlations of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data. *Ann Rheum Dis*, v.62, p.651-654, 2003.

- 68 MURPHY, W.J., BLAZAR, B.R. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Current Opinion in Immunol.*, v.11, p.509-515, 1999.
- 69 NAGLER, R.M., MARMARY, Y., KRAUSZ, Y., CHISIN, R., MARKITZIU, A., NAGLER, A. Major salivary gland dysfunction in human acute and chronic graft-versus-host disease (GVHD). *Bone Marrow Transplant.*, v.17, p.219-224, 1996.
- 70 NAGLER, R.M., SHERMAN, Y., NAGLER, A. Histopathological study of the human submandibular gland in graft versus host disease. *J. Clin. Pathol.*, v.52, n.5, p.395-397, 1999.
- 71 NAKAMURA, S. HIROKI, A., SHINOHARA, M., GONDO, H., OHYAMA, Y., MOURI, T., SASAKI, M., SHIRASUNA, K., HARADA, M., NIHO, Y. Oral involvement in chronic graft-versus-host disease after allogenic bone marrow transplantation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 86, p. 556-563, 1996.
- 72 NAKHLEH, R.E., MILLER, W., SNOVER, D.C. Significances of mucosal vs salivary gland changes in lip biopsies in the diagnosis of chronic graft-versus-host disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.113, p.932-934, 1989.
- 73 NELSON, J.L., FURST, D.E., MALONEY, S., GOOLEY, T., EVANS, P.C., SMITH, A. *et al.* Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet*, v. 351, p. 559-562, 1998.
- 74 O'DONOGHUE, K., CHAN, J., DE LA FUENTE, J., KENNEA, N., SANDISON, A., ANDERSON, J.R., ROBERTS, I.A., FISK, N.M. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet*, v. 364, p. 179-182, 2004.

- 75 OKUNEWICK, J.P., KOCIBAN, D.L., MACHEN, L.L., BUFFO, M.F. Effect of donor and recipient gender disparities on fatal graft-vs-host disease in a mouse model for major histocompatibility complex-matched unrelated-donor bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.*, v.21, n.12, p.1570-1576, 1993.
- 76 RAPPEPORT, J., MIHRN, M., REINHERZ, E., LOPANSRI, S., PARKMAN, R. Acute graft-versus-host disease in recipients of bone marrow transplants from identical twin donors. *Lancet*, v.2, p. 717-720, 1979.
- 77 REED, A.M., PICORNELL, Y.J., HARWOOD, A., KREDICH, D.W. Chimerism in children with juvenile dermatomyositis. *Lancet*, v. 356, p. 2156-2157, 2000.
- 78 RODU, B., GOCKERMAN, J.P. Oral manifestations of chronic graft-v-host reaction. *JAMA*, V.249, N.4, P. 504-507, 1983.
- 79 SALE, G.E., SHULMAN, H.M., HACKMAN, R.C. Bone Marrow. In: COLVIN, R.B.; BHAN, A.K., McCLUSKEY, R.T. *Diagnostic Immunopathology*. 2 ed. New York: Raven, 1995. Cap. 25, p. 435-453.
- 80 SALE, G.E., SHULMAN, H.M., SCHUBERT, M.M., SULLIVAN, K.M., KOPECKY, K.J., HACKMAN, R.C., MORTON, T.H., STORB, R., THOMAS, D. Oral and ophthalmic pathology of graft versus host disease in man: predictive value of lip biopsy. *Human Pathol.*, Philadelphia, v.12, n.11, p. 1022-1030, 1981.
- 81 SANTOS, G.W., TUTSCHKA, P.J., BROOKMEYER, R. *et al.* Marrow transplantation for acute non lymphocytic leukemia after treatment with bussulfan and ciclophosphamide. *New Eng. J. Med.*, v. 309, p. 1347-1353, 1983.

- 82 SAURAT, J.H., DIDIER-JEAN, L., GLUCKMAN, E., BUSSEL, A. Graft versus host reaction and lichen planus-like eruption in man. *Brit. J. Dermat.*, v.92, p. 591-592, 1975.
- 83 SAWAYA, H.H.B., JIMENEZ, S.A., ARLETT, C.M. Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis. *Rheumatology*, v. 43, p. 965-968, 2004.
- 84 SCHUBERT M.M., CORREA, M.E.P. Oral Graft-Versus-Host Disease. *Dent. Clin. N. Am.* V.52, p. 79-109, 2008.
- 85 SCHUBERT M.M., PETERSON, D.E., LLOYD, M.E. Oral complications. In: THOMAS, E.D., BLOOME, Q.G., FORMAN, S.J. *Hematopoietic cell transplantation*. 2ed. [s.l.]: Blackwell Science, 1999, Cap. 64, p.751-775.
- 86 SCHUBERT, M.M., SULLIVAN, K.M., MORTON, T.H., IZUTSU, K.T., PETERSON, D.E., FLOURNOY, N., TRUELOVE, E.L., SALE, G.E., BUCKNER, C.D., STORB, R. THOMAS, E.D. Oral manifestations of chronic graft-v-host disease. *Arch. Intern. Med.*, v.144, p. 1591-1595, 1984.
- 87 SHULMAN, H.M., SALE, G.E., LERNER, K.G., BARKER, E.A., WELDEN, P.L., SULLIVAN, K., GALLUCCI, B., THOMAS, E.D., STORB, R. Chronic cutaneous graft-versus-host disease in man. *Am. J. Pathol.*, v.91, n.3, p. 545-570, 1978.
- 88 SOUZA, L.N., CARNEIRO, M.A., AZEVEDO, W.M., GOMEZ, R.S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in salivary glands of bone marrow transplant (BMT) recipients. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 33, p. 13-16, 2004.
- 89 SPYRIDONIDIS, A., SCHMITT-GRÄFF, A., TOMANN, T., DWENGER, A., FOLLO, M., BEHRINGER, D., FINKE, J. Epithelial Tissue Chimerism

- after human hematopoietic cell transplantation is a real phenomenon. *American Journal of Pathology*, v.164, n.4, p.1147-1155, 2004.
- 90 STARZL, T.E; DEMETRIS, A.J., TRUCCO, M., MURASE, N., RICORDI, C., ILDSTAD, S., *et al.* Cell migration and chimerism after whole organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology*, v. 17, p. 1127-1152, 1993.
- 91 STORB, R., DEEG, H.J. Failure of allogeneic canine marrow grafts after total body irradiation: allogeneic “resistance” vs transfusion induced sensitization. *Transplantation*, v. 42, p. 571-580, 1986.
- 92 STORB, R., PRENTICE, R., THOMAS, E.D. Treatment of aplastic anemia by marrow transplantation from HLA identical siblings; prognostic factors associated with graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.*, v.59, p. 625, 1977.
- 93 SULLIVAN, K.M. Acute and Chronic graft-versus-host disease in man. *Int. J. Cell Cloning*, v.4, p. 77-102, 1986.
- 94 SULLIVAN, K.M., SHULMAN, H.M., STORB, R., WEINDEN, P.L., WITHERSPOON, R.P., McDONALD, G.B., SCHUBERT, M.M., ATKINSON, K., THOMAS, E.D. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successfully treatment with combination immunosupresion. *Blood*, v.57, 267-276, 1981.
- 95 TABAK, D.G. *Transplante de medula óssea III*. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea, p. 03-09, 1993.
- 96 TABAK, D.G. *Transplante de medulla óssea I*. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea, p. 03-07, 1991.
- 97 TABAK, D.G. *Transplante de medulla óssea II*. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Transplante de Medula Óssea, p. 03-10, 1992.

- 98 TERADA, N. HAMAZAKI, T., OKA, M., HOKI, M., MASTALERZ, D.M., NAKANO, Y., MEYER, E.M., MOREL, L., PETERSEN, B.E., SCOTT, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous fusion. *Nature*, v. 416, p. 542-545, 2002.
- 99 THEIN, S.L., GOLDMAN, J.M., GLATON, D.A. Acute graft-versus-host disease after autograft for chronic granulocytic leukemia in transplantation. *Ann. Internal Med.*, v. 94, p. 210-211, 1981.
- 100 THOMAS, E.D., STORB, R., CLIFT, R.A., FEFER, A., JOHNSON, F.L., NEIMAN, P.E., LERNER, K.G., GLUCKSBERG, H., BUCKNER, C.D. Bone marrow transplantation, first of two parts. *N. Engl. J. Med.*, v. 292, n. 16, p. 832-843, 1975 a.
- 101 THOMAS, E.D., STORB, R., CLIFT, R.A., FEFER, A., JOHNSON, F.L., NEIMAN, P.E., LERNER, K.G., GLUCKSBERG, H., BUCKNER, C.D. Bone marrow transplantation, second of two parts. *N. Engl. J. Med.*, v. 292, n. 17, p. 895-902, 1975 b.
- 102 TOURAINE, R., REVUZ, J., DREYFUS, B., ROCHANT, H., MANNONI, P. Graft versus host reaction and lichen planus. *Brit. J. Dermatol.*, v. 92, p. 589, 1975.
- 103 TRAN, S.D., PILLEMER, S.R., DUTRA, A., BARRETT, A.J., BROWNSTEIN, M.J. *et al.* Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *The Lancet*, v. 361, p. 1084-1088, 2003.
- 104 TRIULZI, D.J., NALESNIK, M.A. Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation. *Transfusion*, v.41, p.419-426, 2001.
- 105 TUTSCHKA, P.J. Diminishing morbidity and mortality of bone marrow

- transplantation. *Vox Sang.*, v. 51, p. 87-94, 1986.
- 106 TUTSCHKA, P.J., COPELAN, E.A., KLEIN, J.P. Bone marrow transplantation for leukemia following a new bussulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood*, n.36, p. 1382-1388, 1987.
- 107 VERDIJK, R.M., KLOOSTERMAN, A., POOL, J., VAN DE KEUR, M., NAIPAL, A.M.I.H., VAN HALTEREN, A.G.S. Pregnancy induces minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells: implications for stem cell transplantation and immunotherapy. *Blood*, v. 103, n.5, 2004.
- 108 VOGELSANG, G.B., HESS, A.D., SANTOS, G.W. Acute graft-versus-host disease: clinical characteristics in cyclosporine era. *Medicine*, v. 67, p. 163-174, 1988.
- 109 VYMETALOVA, Y., BOHUSLAVOVA, J.A., DUFKOVA, B., KOCIK, M., MALEK, I., KAUTZNER, J. High Prevalence of Microchimerism in Female Patients. *Transplant. Proc.*, v.40, p. 3685-3687, 2008.
- 110 WAGNER Jr., J.E., VOGELSANG, G.B., BESCHORNER, W.E. Pathogenesis and pathology of graft-vs-host disease. *The American J. Pediat. Hemat. Oncol.*, v. 11, n. 2, p. 196-212, 1989.
- 111 WAGNER, J.L., FLOWERS, M.E.D., LONGTON, G., STORB, R., SCHUBERT, M., SULLIVAN, K.M. The development of chronic graft-versus-host disease: an analysis of screening studies and the impact of corticosteroid use at 100 days after transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v. 22, n. 2, p. 139-146, 1998.
- 112 WEDDELL, J.A., McKOWN, C.G., SANDERS, B.J., JONES, J.E. Problemas dentários da criança deficiente. In: McDONALD, R.E., AVERY, D.R. *Odontopediatria*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995. Cap.

- 23, p. 404-445.
- 113 WEGER, W., BAUER, M., ODELL, E., PERTL, B., CERRONI, L., KERL, H., JAKSE, N., PERTL, C. Role of microchimerism in the patogenesis of oral lichen planus. *Exp. Dermatol.*, v. 15, p. 125-129, 2006.
- 114 WINGARD, J.R., PIANTADOSI, S., VOGELSANG, G.B., FARMER, E.R., JABS, D.A., LEVIN, L.S., BESCHORNER, W.E., CAHILL, R.A., MILLER, D.F., HARRISSON, D. *et al.* Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Blood*, v. 74, p. 1428-1435, 1989.
- 115 WOO, S-B, SONIS, S.T., MONOPOLI, M.M., SONIS, A.L. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer*, v. 72, n. 5, p. 1612-1617, 1993.
- 116 WOO, S-B., LEE, S.J., SCHUBERT, M.M. Graft-versus-host disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 8, n. 2, p. 201-216, 1997.
- 117 YAMADA, H., CHIHARA, J., HAMADA, K., MATSUKURA, M., YUDATE, T. MAEDA, K. TUBAKI, K., TEZUKA, T. Immunohistology of skin and oral biopsies in graft-versus-host disease after bone marrow transplantation and cytokine therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 100, n. 6 (2), p. 573-576, 1997.
- 118 YAN, Z., LAMBERT, N.C., GUTHRIE, K.A., PORTER, A.J., LOUBIERE, L.S., MADELEINE, M.M., STEVENS, A.M., HERMES, H.M., NELSON, J.L. Male microchimerism in women without sons: Quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am. J. Med.*, v. 118, p. 899-906, 2005.
- 119 YING, Q.L., NICHOLS, J., EVANS, E.P., SMITH, A.G. Changing potency

by spontaneous fusion. *Nature*, v. 416, p. 545-548.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 373/08

**Interessado(a): Prof. Ricardi Santiago Gomez
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 17 de setembro de 2008, o projeto de pesquisa intitulado **"Microquimerismo do cromossomos Y em glândulas salivares labiais em pacientes submetidas a transplante de células tronco hematopoiéticas"** 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. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**