

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEPHANIE VON STEIN CUBAS WARNAVIN

ANÁLISE FTIR DA SALIVA DE PACIENTES COM DESENVOLVIMENTO DE  
DECH APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS - TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS

CURITIBA

2023

STEPHANIE VON STEIN CUBAS WARNAVIN

ANÁLISE FTIR DA SALIVA DE PACIENTES COM DESENVOLVIMENTO DE DECH  
APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS - TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Juliana Lucena Schussel

CURITIBA

2023

Warnavin, Stephanie Von Stein Cubas

Análise FTIR da saliva de pacientes com desenvolvimento de DECH após transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas [recurso eletrônico] / Stephanie Von Stein Cubas Warnavin. – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Doutorado (tese) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Lucena Schussel.

1. Saliva. 2. Imunologia. 3. Células-tronco hematopoiéticas. 4. Biomarcadores. I. Schussel, Juliana Lucena. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.0592



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -  
40001016065P8

**ATA Nº226**

## **ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM ODONTOLOGIA**

No dia sete de dezembro de dois mil e vinte e três às 08:30 horas, na sala Plataforma Teams, Campus Botânico, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **STEPHANIE VON STEIN CUBAS WARNAVIN**, intitulada: **ANÁLISE FTIR DA SALIVA DE PACIENTES COM DESENVOLVIMENTO DE DECH APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA LUCENA SCHUSSEL. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JULIANA LUCENA SCHUSSEL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), PAULO HENRIQUE BRAZ SILVA (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela Aprovada. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutora está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JULIANA LUCENA SCHUSSEL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 07 de Dezembro de 2023.

JULIANA LUCENA SCHUSSEL  
Presidente da Banca Examinadora

MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

PAULO HENRIQUE BRAZ SILVA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -  
40001016065P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **STEPHANIE VON STEIN CUBAS WARNAVIN** intitulada: **ANÁLISE FTIR DA SALIVA DE PACIENTES COM DESENVOLVIMENTO DE DECH APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA LUCENA SCHUSSEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovada no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Dezembro de 2023.

JULIANA LUCENA SCHUSSEL  
Presidente da Banca Examinadora

MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

PAULO HENRIQUE BRAZ SILVA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)



## USPAssina - Autenticação digital de documentos da USP

### Registro de assinatura(s) eletrônica(s)

Este documento foi assinado de forma eletrônica pelos seguintes participantes e sua autenticidade pode ser verificada através do código J58Q-NFMI-IF1J-MGIF no seguinte link: <https://portalservicos.usp.br/iddigital/J58Q-NFMI-IF1J-MGIF>

**Paulo Henrique Braz da Silva**

Nº USP: 3097651

Data: 24/04/2024 13:49

gov.br Documento assinado digitalmente  
**JOSE MIGUEL AMENABAR CESPEDES**  
Data: 24/04/2024 19:36:27-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

gov.br Documento assinado digitalmente  
**MELISSA RODRIGUES DE ARAUJO**  
Data: 24/04/2024 16:35:23-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

gov.br Documento assinado digitalmente  
**JULIANA LUCENA SCHUSSEL**  
Data: 25/04/2024 17:43:22-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e à minha querida família, que com apoio inabalável e amor constante, foram minhas forças propulsoras que me impulsionaram ao longo dos desafios e triunfos desta árdua jornada acadêmica.

À minha mãe, Simone, cujo o incentivo e apoio incondicional serviram de encorajamento constante nos momentos mais desafiadores. Sua fé em mim, moldaram minha jornada, inspirando-me a alcançar alturas que nunca imaginei. Obrigada por ser meus olhos, cérebro e coração quando eu mais precisava.

Ao meu pai, Anatolio, que nunca me deixou desanimar e desistir em nenhum momento da minha vida. Que, por muitas vezes, cedeu as únicas forças que tinha para continuar ao meu lado. Obrigada por me inspirar com sua determinação, valores e jeito leve, de sorriso fácil. Seu exemplo de trabalho árduo e dedicação foram as bases para minha própria busca.

Ao meu amado irmão Luís, que me inspira todos os dias a ser melhor, buscar sempre a excelência, batalhar firme e não desistir, mas nunca esquecer de ser correto, ético, amoroso e ter cuidado com o próximo. Obrigada por ser meu exemplo.

Ao meu querido irmão Junior, que é exemplo de garra, perseverança e resiliência. Que apesar de todas as marés revoltas, soube e sabe aproveitar o melhor que a vida oferece. Obrigada por colocar em nossas vidas, o carinho mais legal que já conhecemos, o Manu.

Ao meu Tio Orlando, que me recebe a vida toda com o melhor abraço do mundo. Quero que o senhor saiba que te admiro muito. Exemplo de superação e resiliência. Muitas das nossas conversas, fizeram-me chegar até aqui.

À minha prima Larissa, que é minha inspiração diária, tanto pessoal quanto profissionalmente. Sei que minha veia cientista veio de você. Muitas das decisões que tomei na minha vida, foram inspiradas em você, e saiba que foram as melhores decisões que já tive. Obrigada por ser meu ombro para chorar, a mão que puxa minha orelha e a pessoa que tem as epifanias mais legais.

Ao meu parceiro de pesquisa e de vida Rafael Zancan. Não tenho palavras para agradecer por estar ao meu lado nessa jornada. Foram muitos desafios, mas principalmente risadas, papos cabeça e coxinha na padoca. Obrigada por me aceitar como dupla e continuar na jornada comigo.

À minha amiga Laila Hagen, cuja paciência infinita, compreensão incondicional e amizade foram a luz que iluminou os momentos mais turbulentos. Você chegou de

fininho, mas tomou um espaço gigante no meu coração. Você é luz por onde passa. Sem contar que me apresentou uma das melhores pessoas, Rodrigo Lima.

Ao meu amigo Rodrigo Lima, por acreditar em mim mais do eu mesma. Ser meu refúgio e melhor parceiro de conversas, jogatinas e violão que alguém poderia ter. Gostaria de dar atenção que você merece, amigão. Prometo (de verdade) ser mais presente.

A minha amiga Mariana Sassi, por ser simplesmente luz em todos os momentos. Você foi a mão que me puxou quando estava sem saber para onde ir. Obrigada por ser meu ombro amigo sempre e sempre me tirar muitas risadas. Sou muita grata por você ter entrado na minha vida.

A minha melhor amiga Mayara Eggert, por estar ao meu lado desde 2009. Mesmo com a vida nos levando para caminhos diferentes, em cidades diferentes (finalmente estamos juntas), você nunca deixou de me apoiar e enfatizar como nossa amizade é importante. Você esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, nunca me esquecerei disso. Ainda bem que não lembro da minha vida sem você.

À minha orientadora Juliana Schussel, expresso minha profunda gratidão por ser não apenas uma mentora, mas também uma fonte constante de inspiração acadêmica, profissional e pessoal. Suas orientações, conselhos e encorajamento constante foram a bússola que guiou meus passos, capacitando-me a superar desafios e aprimorar minhas habilidades como pesquisadora. Obrigada por não deixar minha ansiedade consumir e por sempre dizer que tudo daria certo, e de fato, deu certo.

Que este trabalho sirva como uma expressão modesta do quanto todos vocês me inspiram e são influências profundas e duradouras na minha vida. Com todo o meu amor e gratidão, dedico este trabalho a todos vocês, que fizeram toda essa jornada valer a pena. Juntos, vocês formam a espinha dorsal da minha caminhada e guiaram-me ao longo de todo o trajeto. Este trabalho é uma homenagem a vocês, que sempre acreditaram em meu potencial, incentivando-me a perseguir meus sonhos.

## RESUMO

A saliva é um biofluido complexo composto por água, íons inorgânicos, proteínas (imunoglobulinas e enzimas), hormônios, muco, ureia e ácido úrico e por isso se torna alvo de diversas pesquisas, principalmente pela coleta simples e não invasiva. Biomarcadores salivares já são utilizados para diagnósticos, prevenção e monitoramento de várias doenças. O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico (TCTH - alo) é utilizado tratamento para uma vasta gama de doenças hematológicas. Entretanto, a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) é o maior efeito adverso deste tratamento, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade observadas após o TCTH - alo. Visando a necessidade de novas terapias para o controle da DECH e compreender a resposta do enxerto ao hospedeiro e evitar imunossupressão, o estudo das vias metabólicas estão se destacando, pelas necessidades energéticas das células imunes. A espectroscopia FTIR se destaca pela eficácia na análise de amostras biológicas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de FTIR para analisar biomarcadores salivares de pacientes pós TCTH – alo que desenvolveram DECH, a fim de identificar alterações que possam favorecer o diagnóstico desta complicação. Os resultados deste estudo mostram uma diminuição proteica em pacientes com DECH quando comparados ao grupo controle. Observou-se bandas comuns com os achados em doenças autoimunes, como psoríase, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn e diabetes, que pode estar relacionado com as semelhanças de células envolvidas e manifestações clínicas, o que se mostra um fator importante para o entendimento da DECH. Além disso, os grupos com DECH apresentaram menor absorção em bandas correspondentes a  $\text{IFN-}\gamma$  ( $1,049 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1,060 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1,047 \text{ cm}^{-1}$  e  $1,054 \text{ cm}^{-1}$ ), que desempenha um papel crucial no sistema imune, evidenciando um fator de imunossupressão nos pacientes. Este estudo foi o primeiro que se sabe na literatura acadêmica utilizando a espectroscopia FTIR para análise salivar de DECH. Os resultados encontrados mostram-se promissores na busca de biomarcadores para a DECH, auxiliando no diagnóstico desta doença, bem como no tratamento e diminuição da morbidade e mortalidade.

Palavras – chave: Saliva; imunologia; células –tronco hematopoiéticas, biomarcador.

## ABSTRACT

Saliva is a complex biofluid composed of water, inorganic ions, proteins (immunoglobulins and enzymes), hormones, mucus, urea, and uric acid, making it the focus of numerous research efforts, primarily due to its simple and non-invasive collection. Salivary biomarkers are already employed in the diagnosis, prevention, and monitoring of various diseases. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (allo-HSCT) is utilized as a treatment for a wide range of hematologic disorders. However, Graft-versus-Host Disease (GVHD) is the major adverse effect of this treatment, being the primary cause of morbidity and mortality observed after allo-HSCT. Recognizing the need for new therapies to control GVHD, understand the graft-versus-host response, and avoid immunosuppression, the study of metabolic pathways is gaining prominence due to the energy requirements of immune cells. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) stands out for its effectiveness in analyzing biological samples. Thus, the objective of this study was to employ FTIR to analyse salivary biomarkers in patients post-allo-HSCT who developed GVHD, aiming to identify alterations that facilitate the diagnosis of this complication. The results of this study indicate a decrease in protein content in patients with GVHD compared to the control group. Common bands were observed with findings in autoimmune diseases such as psoriasis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, and diabetes, which may be related to similarities in involved cells and clinical manifestations, proving to be crucial for understanding GVHD. Additionally, the GVHD groups showed reduced absorption in bands corresponding to IFN- $\gamma$  (1,049 cm<sup>-1</sup>; 1,060 cm<sup>-1</sup>; 1,047 cm<sup>-1</sup> and 1,054 cm<sup>-1</sup>), a crucial player in the immune system, indicating an immunosuppressive factor in patients. This study represents the first documented instance in academic literature using FTIR spectroscopy for the salivary analysis of GVHD. The findings are promising in the quest for biomarkers for GVHD, aiding in the diagnosis of this disease, as well as in treatment and the reduction of morbidity and mortality.

Keywords: Saliva; immunology; hematopoietic stem cells; biomarker.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectros médios do grupo controle e do grupo UD	28
<b>Figura 2:</b> Espectros médios do grupo controle e do grupo DD.	29
<b>Figura 3:</b> Espectros médios dos grupos UD e DD.	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados demográficos, doença subjacente, tipo e fonte de enxerto, condicionamento e imunoprofilaxia de pacientes.	25
<b>Tabela 2:</b> Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos controle e UD.	28
<b>Tabela 3:</b> Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos controle e DD.	30
<b>Tabela 4:</b> Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos DUE DD.	31

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
TCTH – alo	Transplante De Células-Tronco Hematopoiéticas Alogênico
DECH	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
NIH	<i>National Institutes Of Health</i>
CMV	Citomegalovírus
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
$\mu$ L	Micro litro
ml	Mililitro
PLS – DA	Partial Least-Squares Discriminant Analysis
UD	Dech nica
DD	DECH em mais de uma Localização
DNA	cido Desoxirribonucleico
RNA	cido Ribonucleico
IFN – $\gamma$	Interferon-Gama
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IR	Infravermelho
STMO-CHC	Serviço de Transplante de Medula óssea do Complexo Hospital de Clínicas

## SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	19
3. Desenvolvimento/Artigo	20
4. Conclusão	45
5. Referências	46
Apêndice 1 - Artigos publicados ao longo do curso de Pós – Graduação/Doutorado	60

## 1. INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido corporal complexo (Llena-Puy, 2006), que possui ação detergente para a cavidade oral e lubrificante para a ingestão de alimentos. Aproximadamente 600 ml de saliva são produzidas por dia em um adulto saudável, com uma faixa de pH de 6,6 a 7,1 (Zhang *et al.* 2016). É secretada principalmente por três pares de glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual), bem como numerosas glândulas salivares menores. Este biofluido é composto por 99% água, além de uma variedade de íons inorgânicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ), proteínas (imunoglobulinas e enzimas), hormônios, muco, uréia e ácido úrico formando a porção restante (Sun *et al.* 2015; Bonifacio *et al.* 2015)

Devido a sua coleta simples e não invasiva, a saliva despertou o interesse de pesquisas. Este biofluido tem sido estudado para teste do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como fator indicativo para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a detecção do HPV para Papilomavírus Humano e Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (Wang *et al.* 2015) e mais recentemente, a COVID-19 (Bandeira *et al.* 2022; Chen, Liu, Lee, 2022; Ning *et al.* 2021). Outros testes também têm mostrado resultados promissores, como os testes de enzimas miocárdicas para monitoramento de infarto do miocárdio e testes hormonais, como o cortisol, que têm sido utilizados na identificação de estresse e inflamação. Além disso, os estudos de biomarcadores salivares mostram ser importantes para o diagnóstico em doenças bucais, diabetes, doenças renais, hepatite, doenças neurodegenerativas e doenças de imunodeficiência (Song *et al.* 2023). Desta forma, a saliva tem sido utilizada para o diagnóstico precoce, triagem, prevenção e monitoramento do processo de várias doenças, através de seus biomarcadores (Sun *et al.*, 2015; Zhang, Sun, Wang, 2012; Lee, Wong, 2009; Farah *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Shah, 2018; Gug *et al.*, 2019).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (TCTH - alo) é utilizado como terapia curativa para uma vasta gama de doenças hematológicas, malignas ou benignas (Riddell, Appelbaum, 2007). Este tratamento consiste em uma combinação de terapia com células-tronco, terapia convencional e imunoterapia, abordando um regime de condicionamento que inclui agentes quimioterápicos com ou sem irradiação corporal total e/ou anticorpos, que destrói células malignas/cancerígenas, permitindo que o sistema imunológico do receptor

aceite a infusão de células tronco hematopoiéticas do doador, visando a reconstituição do sistema imunológico (Jenq, van den Brink, 2012). De forma resumida, o sistema imune do doador reconhece células tumorais residuais como “estranhas” do ponto de vista imunológico e é capaz de erradicá-las, esse sistema é descrito como “efeito enxerto versus tumor” (Riddell, Appelbaum, 2007).

O efeito benéfico do TCTH - alo depende das células T do doador que promovem o enxerto de medula óssea e medeiam o efeito enxerto-versus-tumor contra células cancerosas residuais que sobrevivem ao regime de condicionamento. Entretanto, a principal desvantagem deste tratamento envolvendo alorreatividade das células T do doador é a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), onde estas células T alorreativas atacam órgãos-alvo do hospedeiro, entre eles: pele, cavidade, fígado, intestino, timo, sistema nervoso central, sistema reprodutor e sistema hematopoiético (Zeiser & Blazar, 2017b; Zeiser & Blazar, 2017b; Shumoji *et al.*, 2017; Shono & van den Brink, 2018).

A DECH é a principal causa de morbidade e mortalidade observadas após o TCTH - alo (Kernan *et al.*, 1986; Hansen *et al.*, 1990; Zeiser & Blazar, 2017). Atualmente sabe-se que as células imunocompetentes são os linfócitos T que estão presentes no inóculo de células-tronco e são fundamentais para uma resposta imune eficaz (Kernan *et al.*, 1986). Um sistema imunológico saudável tem a capacidade de rejeitar células T de um doador. Entretanto, quando o sistema imunológico do receptor é comprometido por consequência do uso de vários agentes imuno-ablativos (quimioterapia e/ou radioterapia), o receptor torna-se incapaz de rejeitar as células transplantadas. Entende-se que os antígenos que diferem em doador e receptor são os antígenos leucocitários humanos (HLA), e sua expressão nas superfícies das células é crucial para a ativação de células T alogênicas e para que a DECH se inicie (Martin *et al.*, 1990).

A DECH foi dividida em fases aguda e crônica, com características clínicas distintas e ocorrem com diferentes cinéticas temporais após o transplante (Ferrara, Deeg & Burakoff, 1997; Reddy, 2003; Higman & Vogelsang, 2004). Essa divisão foi realizada com base em critérios relacionados ao tempo em que se desenvolvia, antes ou depois do D+100 pós TCTH, respectivamente (Glucksberg *et al.*, 1974; Toubai, Sun, Reddy, 2008). Entretanto, essa divisão foi reavaliada de acordo com o quadro clínico em detrimento ao momento do seu surgimento. Está claro que a

DECH aguda pode ocorrer após o dia 100 como DECH agudo tardio (após a cessação da imunossupressão ou após a infusão de linfócitos do doador) ou causar síndrome de sobreposição de DECH agudo e DECH crônica (Toubai, Sun, Reddy, 2008; Ramachandran, Kolli, Strowd, 2019). Os atuais critérios de consenso do *National Institutes of Health* (NIH) utilizam achados clínicos para diferenciar entre DECH aguda e DECH crônica, em vez de um limiar de 100 dias (Jagasia et al., 2015). A DECH aguda, de modo geral, é caracterizada por um processo destrutivo do tecido celular, e a DECH crônica é caracterizada por células T, cooperatividade de células B, deposição de anticorpos e fibrose (Zeiser & Blazar, 2017a; Zeiser & Blazar, 2017b).

A DECH aguda se apresenta como uma síndrome inflamatória que geralmente atinge a pele (81%), o trato gastrointestinal (54%) e fígado (50%) (Martin et al., 1990). Geralmente, o dano a esses órgãos é identificado facilmente pela equipe de saúde, pois os sintomas são evidentes, como diarreia, aumento da bilirrubina e erupções cutâneas. No entanto, há uma crescente quantidade de evidências que sugere que outros órgãos, nos quais o dano agudo pode ser menos visível ou mais desafiador de distinguir da toxicidade do medicamento, como o sistema nervoso central, pulmões, ovários e testículos, timo, medula óssea e rins, também podem ser afetados pela DECH aguda (Zeiser & Teshima, 2021).

Por outro lado, DECH crônica tem manifestações mais proteicas e é caracterizada pelo surgimento de características clínicas que se assemelham muito a doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren, esclerodermia e artrite reumatoide (Sherer & Shoenfeld, 1988). Fatores de risco amplamente reconhecidos ligados ao desenvolvimento de DECH crônica incluem doador do sexo feminino para receptor masculino, idade do receptor, utilização de sangue periférico como fonte de células-tronco, incompatibilidade HLA, infusão de um grande número de células T, sorologia positiva para Citomegalovírus (CMV) e histórico de DECH aguda (Flowers et al., 2010; Grube et al., 2016).

Visando a necessidade de novas terapias para atuar no controle da DECH, compreender a resposta do enxerto ao hospedeiro e evitar imunossupressão, o estudo das vias metabólicas em populações de células imunes estão se destacando, devido ao substrato especializado e às necessidades energéticas dos tipos de células imunes. A grande demanda de proliferação, diferenciação e

migração das células T e B causadoras de DECH, bem como de células envolvidas no reparo tecidual, dependem da disponibilidade de substrato suficiente que pode ser usado por vias metabólicas para produção robusta de ATP, biossíntese e reações de redução-oxidação. Uma vez que esses processos ocorrem em diferentes ambientes por tipos celulares distintos, existe uma oportunidade terapêutica para inibir a patogênese da DECH enquanto favorece os mecanismos de reparo celular (Mohamed et al., 2021).

Na última década, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) demonstrou eficácia na análise de amostras biológicas e destacou-se como um método de diagnóstico clínico (Jermyn et al., 2015; Zapata, de La Ossa, García - Ruiz, 2015), por oferecer informações importantes sobre alterações em macromoléculas, como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, em uma amostra (Ferreira et al., 2020; Alkhuder, 2022; Zheng et al., 2018). Além de ser uma técnica simples, rápida e sem necessidade de uso de reagentes, que fazem o custo do teste ser menor e mais acessível (Chou et al., 2015). FTIR trata-se de um método de espectroscopia vibracional baseada na medição da absorção de radiação eletromagnética com comprimentos de onda na região do infravermelho médio (IR) ( $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), capaz de fornecer informações quantitativas e qualitativas a nível molecular de forma multiplexada, que identifica variações em grupos funcionais através da medida da vibração e rotação de moléculas influenciadas pela IR (Jermyn et al., 2015; Yang et al., 2015). Desta forma, esse método vem sendo considerado uma ferramenta valiosa e promissora para análise de diversas amostras como, por exemplo, saliva, soro, plasma, urina e tecidos; e já é ofertada como uma técnica complementar para o diagnóstico clínico e caracterização de várias doenças (Jermyn et al., 2015; Lin et al., 2018; Mitropoulos et al., 2018; Morais et al., 2020; Ildiz et al., 2015), incluindo as lesões onde o diagnóstico precoce é um fator importante para o prognóstico (Udi et al., 2015).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar características bioquímicas da saliva de pacientes que desenvolveram DECH após TCTH.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar as características bioquímicas da saliva de pacientes que desenvolveram não desenvolveram DECH após TCTH – alo.
- Identificar diferenças bioquímicas salivares de pacientes que desenvolveram DECH em apenas uma região e em duas regiões simultaneamente.
- Avaliar bandas/características bioquímicas da saliva que são descritas em doenças imunomediadas.
- Identificar características bioquímicas salivares que possam auxiliar no diagnóstico da DECH.

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### **ANÁLISE FTIR DA SALIVA DE PACIENTES COM DESENVOLVIMENTO DE DECH APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Stephanie von Stein Cubas Warnavin<sup>1</sup>, Rafael Zancan Mobile<sup>1</sup>, Leticia Marques Caviola Foaini<sup>2</sup>, Herculano da Silva Martinho<sup>2</sup>, Teresinha Keiko Kojo<sup>3</sup>, Juliana Lucena Schussel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Estomatologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Santo André, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Complexo Hospital de Clínicas, Serviço de Transplante de Medula Óssea, Curitiba, Paraná, Brasil

Autor correspondente: Juliana Lucena Schussel

Universidade Federal do Paraná, Departamento de Estomatologia, Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba. PR, Brasil.

E-mail: juliana.schussel@ufpr.br

Título resumido: Análise de Espectroscopia FTIR da Saliva de Pacientes com DECH.

## Resumo

A saliva tem sido utilizada para o diagnóstico, triagem, prevenção e monitoramento do processo de várias doenças, através de seus biomarcadores. O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênico (TCTH – alo) é uma terapia curativa para inúmeras doenças hematológicas, entretanto, a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) é a principal causa de morbidade e mortalidade após o transplante. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar características bioquímicas da saliva de pacientes que desenvolveram DECH após TCTH – alo e encontrar possíveis biomarcadores salivares para a doença. A saliva dos pacientes foi coletada antes e até 210 dias após o TCTH - alo. As amostras de pacientes com manifestações de DECH e seus respectivos controles foram analisadas através da espectroscopia FTIR. Os resultados deste estudo apontam uma diminuição proteica em pacientes com DECH. Observou-se bandas comuns com doenças autoimunes, como psoríase, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e diabetes. Esse fato pode estar relacionado com as semelhanças de células envolvidas e manifestações clínicas, o que se mostra um fator importante para o entendimento da DECH. Os grupos com DECH apresentaram também, menor absorção em bandas correspondentes a  $\text{IFN-}\gamma$  ( $1,049\text{ cm}^{-1}$ ;  $1,060\text{ cm}^{-1}$ ;  $1,047\text{ cm}^{-1}$  e  $1,054\text{ cm}^{-1}$ ), que desempenha um papel crucial na resposta imunológica, evidenciando um fator de imunossupressão nos pacientes. Este estudo foi o primeiro registrado na literatura acadêmica utilizando a espectroscopia FTIR para análise salivar de DECH. Os resultados encontrados mostram-se promissores na busca de biomarcadores para a DECH, auxiliando no diagnóstico desta doença.

**Palavras – Chave:** Saliva, Imunologia, Células – Tronco Hematopoiéticas, Biomarcador.

## Introdução

A saliva é um fluido corporal complexo<sup>1</sup>, com ação detergente e lubrificante para a cavidade oral<sup>2</sup>. Este biofluido é composto por água e uma variedade de íons inorgânicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ), proteínas (imunoglobulinas e enzimas), hormônios, muco, uréia e ácido úrico formando a porção restante<sup>3,4</sup>.

Devido a sua coleta simples e não invasiva, a saliva despertou o interesse de pesquisas<sup>5</sup>. Estudos de biomarcadores salivares mostram ser importantes para o diagnóstico como: doenças bucais, diabetes, doenças renais, hepatite, doenças neurodegenerativas e doenças de imunodeficiência<sup>6</sup>. A saliva tem sido utilizada para diagnóstico precoce, triagem, prevenção e monitoramento do processo de várias doenças, através de seus biomarcadores<sup>3,7-12</sup>.

O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (TCTH - alo) é utilizado como terapia curativa para uma vasta gama de doenças hematológicas, malignas ou benignas. Este tratamento visa a reconstituição do sistema imunológico, onde o sistema imune do doador reconhece células tumorais residuais como “estranhas” e é incapaz de erradicá-las, esse sistema é descrito como “efeito enxerto versus tumor”<sup>13,14</sup>. Entretanto, a principal desvantagem deste tratamento é a Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), onde estas células T alorreativas atacam órgãos-alvo do hospedeiro<sup>15-18</sup>.

A DECH é a principal causa de morbidade e mortalidade observadas após o TCTH alo<sup>15,19</sup>. Essa condição foi dividida em fases aguda e crônica, com características clínicas distintas e ocorrem com diferentes cinéticas temporais após o transplante<sup>20-22</sup>. Essa divisão foi realizada com base em critérios relacionados ao tempo em que se desenvolvia, antes ou depois do D+100 pós TCTH, respectivamente<sup>23,24</sup>. A DECH aguda se apresenta como uma síndrome inflamatória que geralmente atinge a pele (81%), o trato gastrointestinal (54%) e fígado (50%)<sup>25</sup>. Por outro lado, DECH crônica tem manifestações mais proteicas e é caracterizada pelo surgimento de características clínicas que se assemelham muito a doenças autoimunes, eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren,

esclerodermia e artrite reumatoide<sup>25</sup>. Entretanto, essa divisão foi reavaliada de acordo com o quadro clínico em detrimento ao momento do seu surgimento. Está claro que a DECH aguda pode ocorrer após o dia 100 como DECH agudo tardio ou causar síndrome de sobreposição de DECH aguda e crônica<sup>24,26,27</sup>. A DECH aguda, de modo geral, é caracterizada por um processo destrutivo do tecido celular, e a DECH crônica é caracterizada por células T, cooperatividade de células B, deposição de anticorpos e fibrose<sup>15,16</sup>.

Visando a necessidade de novas terapias para atuar no controle da DECH, compreender a resposta do enxerto ao hospedeiro e evitar imunossupressão, o estudo das vias metabólicas em populações de células imunes estão se destacando, devido ao substrato especializado e às necessidades energéticas dos tipos de células imunes<sup>28</sup>.

Na última década, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) demonstrou eficácia na análise de amostras biológicas e destacou-se como um método de diagnóstico clínico<sup>29,30</sup>, por oferecer informações importantes sobre alterações em macromoléculas, como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, em uma amostra<sup>31-33</sup>. Trata-se de um método de espectroscopia vibracional baseada na medição da absorção de radiação eletromagnética com comprimentos de onda na região do infravermelho, capaz de fornecer informações quantitativas e qualitativas a nível molecular, que identifica variações em grupos funcionais através da medida da vibração e rotação de moléculas influenciadas pela IR<sup>29,34</sup>. Desta forma, esse método vem sendo considerado uma ferramenta valiosa e promissora para análise de diversas amostras como, por exemplo, saliva, soro, plasma, urina e tecidos; e já é ofertada como uma técnica complementar para o diagnóstico clínico e caracterização de várias doenças<sup>29,35-38</sup>, incluindo as lesões onde o diagnóstico precoce é um fator importante para o prognóstico<sup>39</sup>. Desta forma, o objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de FTIR para detectar biomarcadores salivares de pacientes pós TCTH – alo que desenvolveram DECH, afim de otimizar o diagnóstico desta complicação.

## **Material e Método**

### ***Coleta e armazenamento das amostras***

Foram coletadas amostras de pacientes, maiores de 18 anos, admitidos no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas (STMO-CHC) da Universidade Federal do Paraná com doenças e/ou condições com indicação de TCTH. A saliva não estimulada foi coletada dos participantes em um recipiente de coleta estéril em 9 tempos: antes do transplante e nos dias 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 após o transplante. Alíquotas das amostras foram separadas em microtubose imediatamente armazenadas em freezer (-80°C) até o momento do uso.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e 1µL de cada amostra foi pipetado em uma placa específica. As placas foram então colocadas em estufa a 40°C para secagem para redução da interferência da água na aquisição dos espectros, formando um filme fino. As amostras foram então analisadas em um FTIR Spectrometer 660 - Varian Inc.

### ***Obtenção e Análise de Espectros FTIR***

As amostras foram analisadas separadamente considerando apenas os grupos desejados. Para cada análise apenas espectros de *fingerprint*, regiões de número de onda foram consideradas para encontrar bandas capazes de caracterizar e diferenciar os grupos amostrais. Todos os espectros foram pré-tratados no software *Rstudio* a fim de remover *baselines*, para que a intensidade das bandas vistas em cada espectro pudesse ser comparada, usando o método conhecido como "ajuste polinomial modificado". O mesmo software também foi usado para selecionar as regiões do espectro a serem analisadas. Posteriormente, os espectros foram analisados no site *MetaboAnalyst*, e dimensionados, para que todas as variáveis (Wavenumbers) estivessem dentro de um intervalo numérico centrado em seu valor médio, o que facilita a progressão do processo de construção da regressão logística. Os espectros passaram por uma discriminante análise quimiométrica através do método PLS-DA. A partir dessa análise, foi possível determinar quais bandas influenciaram a diferenciação dos grupos amostrais estudados com maior relevância.

## Resultados

### Amostras

A amostra foi composta por 25 homens e 18 mulheres, com média de idade de 38,57anos. A doença mais frequente observada nos pacientes incluídos na amostra foi Anemia Aplástica Severa. Dos 43 pacientes, 16 (37,21%) destes desenvolveram DECH. No grupo controle, 85,18% receberam transplante oriundo da medula óssea, enquanto no grupo DECH, 56,25% receberam transplante desta fonte de enxerto. Além disso, o grupo controle teve a Anemia Aplástica Severa (44,44%) como a doença subjacente predominante, na DECH, a doença subjacente mais prevalente foi a Leucemia Mielóide Aguda (43,75%). Quanto à compatibilidade do enxerto, metade (8/50%) dos transplantes do grupo que desenvolveu DECH, apresentou 100% de compatibilidade, no grupo controle foi 55,5%, correspondendo a 15 pacientes. A Tabela 1 detalha os dados demográficos, doenças de base e regimes de condicionamento utilizados, bem como a ocorrência ou não de DECH.

**Tabela 1:** Dados demográficos, doença subjacente, tipo e fonte de enxerto, condicionamento e imunoprofilaxia de pacientes.

Características		DECH	CONTROLE
		N/%	N/%
<b>Idade</b>		21 -62 anos	19 – 60 anos
	Média	40,81 anos	36,33 anos
<b>Sexo</b>	Feminino	5 (11,6%)	13 (30,2%)
	Masculino	11 (25,6%)	14 (32,6%)
<b>Doença Subjacente</b>	Leucemia Linfocítica Aguda	2 (4,7%)	6 (13,9%)
	Leucemia mielóide aguda	7 (16,3%)	5 (11,6%)
	Linfoma não Hodgkin	3 (7,0 %)	1 (2,3%)
	Síndrome Mielodisplásica	1 (2,3%)	2 (4,7%)
	Anemia Aplástica Severa	3 (7,0%)	12 (27,9%)
	Hemoglobinúria Naroxística Noturna	0 (0%)	1 (2,3%)
<b>Tipo do Enxerto</b>	Aparentado	13 (30,2%)	15 (34,9%)
	Não Aparentado	2 (4,7%)	13 (30,2%)

<b>Fonte do Enxerto</b>	Fonte Medular	9 (20,9%)	23 (53,5%)
	Fonte Periférica	7 (16,3%)	4 (9,30%)
<b>Condicionamento</b>	Condicionamento Mieloablativo	11 (25,6%)	24 (55,8%)
	Condicionamento de intensidade reduzida	4 (9,30%)	3 (7,0%)
	Condicionamento não Mieloablativo	1 (2,3%)	0 (0,00%)
<b>Compatibilidade</b>	100% Compatível	8 (50,0%)	15 (55,5%)
<b>Imunoprofilaxia</b>	Imunoprofilaxia CSA +MTX	12 (27,9%)	23 (53,5%)
	Imunoprofilaxia CSA +MMF+GCS-F	1 (2,3%)	1 (2,3%)
	Imunoprofilaxia Cy 100 + CSA + MMF + G-CSF	3 (7,0%)	3 (7,0%)
<b>DECH</b>	DECH Oral	13 (30,2%)	-
	DeCH não oral	14 (32,6%)	-
	DECH ORAL e NÃO ORAL	10 (23,3%)	-

### **Perfil da amostra**

#### **DECH ÚNICA (UD)**

Foram analisadas 14 amostras no grupo UD, com manifestação de DECH em 30, 60,90, 120 e 150 dias após o TCTH - alo. A média de idade encontrada entre os pacientes destas amostras foi de 44.14 anos (29 - 62 anos), sendo 8 do sexo masculino e 6 do sexo feminino. Entre as doenças subjacentes, a maioria apresentava Leucemia Mielóide Aguda (7), seguido de Anemia Aplástica Severa (4), Síndrome Mielodisplásica (2) e Linfoma não Hodgkin (1). Apenas 1 das amostras não apresentava transplante do tipo aparentado. Quanto à compatibilidade, 9 amostras apresentavam compatibilidade de 100%. O mesmo número é visto quanto a fonte do enxerto, onde 9 eram da medula óssea e 5 eram oriundos de sangue periférico. O condicionamento foi predominantemente Mieloablativo (11) e apenas 3 amostras possuíam condicionamento de intensidade reduzida. Por fim, 5 das amostras correspondem a DECH com manifestação oral, enquanto 9 amostras são de manifestações em outra região/órgão.

### **DECH em mais de uma localização (DD)**

Assim como no grupo UD, foram analisadas 14 amostras pertencentes ao grupo DECH em mais de uma localização (DD), com manifestação de DECH em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o TCTH - alo. Importante ressaltar que, para DD, foram inseridas amostras que apresentavam a manifestação de DECH oral e não oral simultaneamente. A média de idade encontrada para este grupo foi de 34.28 anos (21 - 49 anos), com 11 amostras pertencentes ao sexo masculino e 3 ao sexo feminino. Entre as doenças subjacentes, a mais predominante foi a Anemia Aplástica Severa, com 5 amostras, Linfoma não Hodgkin, Leucemia Linfocítica Aguda e Mielóide Agudativeram 3 amostras para cada doença. Todos os enxertos foram do tipo aparentado, sendo a medula óssea a principal fonte de enxerto (11). Quanto à compatibilidade, 9 amostras eram 100% compatíveis. Sobre o tipo de condicionamento, 10 foram do tipomieloablativo, 3 de intensidade reduzida e 1 não mieloablativo.

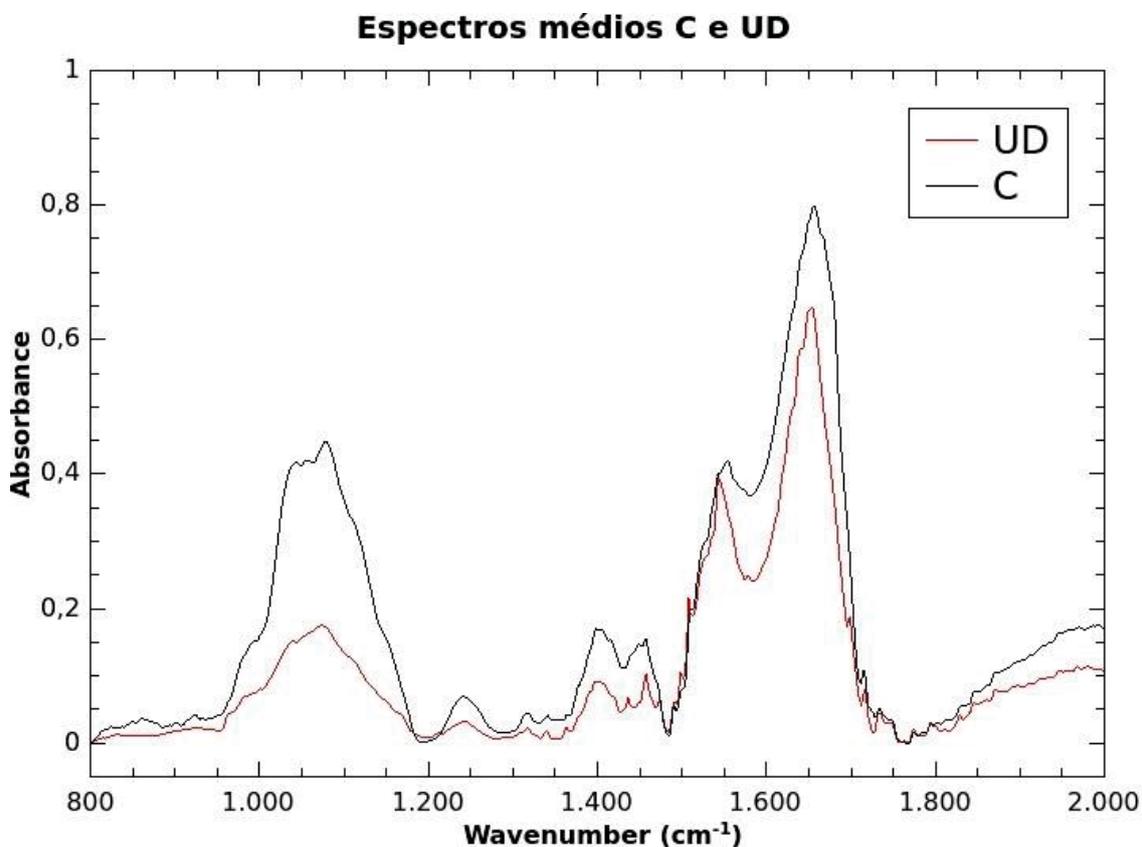
### **Análise de FTIR**

O resultado dos espectros de FTIR foi realizado utilizando PLS-DA nas amostras de pacientes

### **FTIR - DECH Única**

Espectros médios de FTIR para classes de amostras de DECH em apenas um órgão ou tecido apresentaram (linha vermelha) e controle (linha preta) na janela espectral de *fingerprint* ( $880-1800\text{cm}^{-1}$ ) são mostrados na Fig 1. As atribuições para as principais bandas vibracionais são apresentadas na Tabela 2. As bandas vibracionais de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos dominam os espectros de acordo com a composição química nas amostras de saliva. Amostras UD apresentaram diferenças no espectro na região de  $1720-1480\text{cm}^{-1}$ , com um aumento na absorção na banda  $1656,5\text{cm}^{-1}$  (Modo vibracional Amido I.  $\text{C}=\text{O}$  citosina, do grupo das Proteínas) quando comparado ao grupo controle. As demais bandas apresentaram maior absorção no grupo controle.

**Figura 1:** Espectros médios do grupo controle e do grupo UD, onde a maioria das bandas teve maior absorção para o grupo controle.



**Tabela 2:** Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos controle e UD.

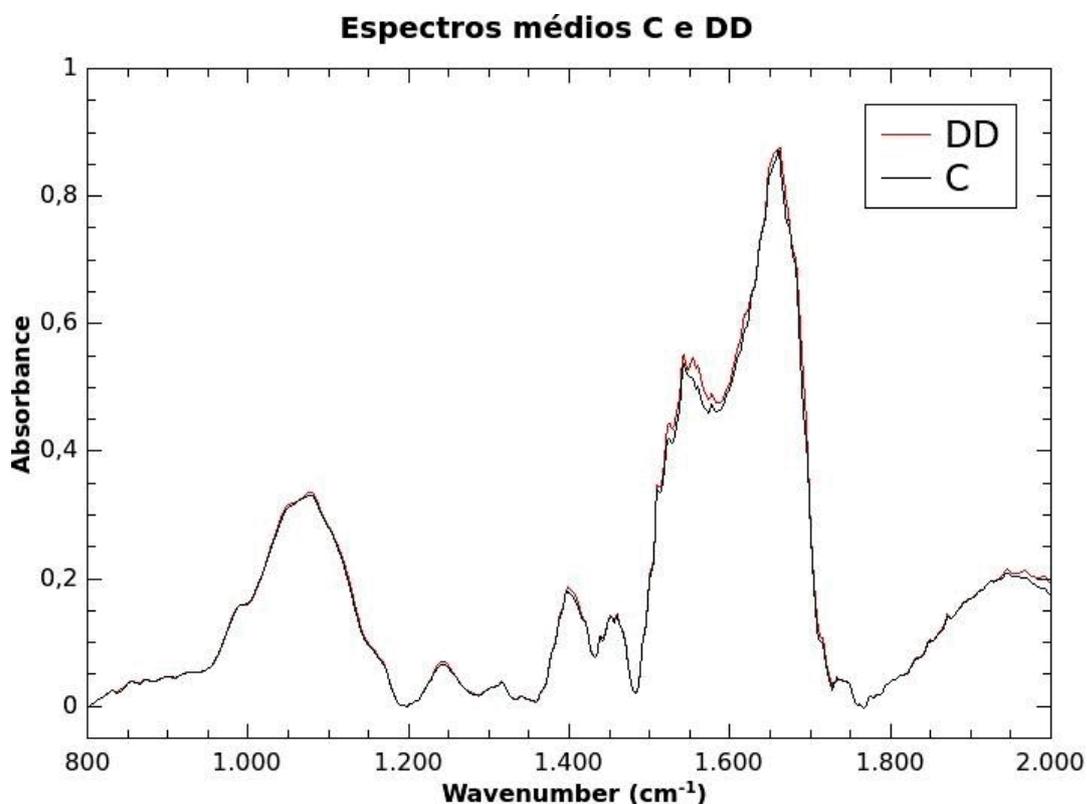
Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Controle	UD	Grupo Molecular
1.677,80	Alta	Baixa	Proteína (Amida II)
1.672,00	Alta	Baixa	Proteína
1.656,50	Baixa	Alta	Proteína
1.643,00	Alta	Baixa	Proteína
1.629,60	Alta	Baixa	Proteína
1.625,70	Alta	Baixa	RNA/DNA
1.604,50	Alta	Baixa	DNA
1.552,40	Alta	Baixa	Proteína (Amida I)
1.546,60	Alta	Baixa	Proteína
1.085,70	Alta	Baixa	Proteína/DNA/RNA
1.076,10	Alta	Baixa	RNA, DNA
1.068,40	Alta	Baixa	RNA
1.060,70	Alta	Baixa	DNA e RNA/ IFN - $\gamma$

1.049,10	Alta	Baixa	Carboidrato e Glicogênio/ IFN - $\gamma$
1.037,50	Alta	Baixa	RNA, DNA e Glicogênio

### **FTIR - DECH mais de uma localização**

Os espectros médios de FTIR para classes de amostras de DECH em mais de uma região (linha vermelha) e controle (linha preta) na janela espectral de *fingerprint* (880–1800  $\text{cm}^{-1}$ ) estão apresentados na Fig. 2. As diferenças observadas nas amostras de pacientes do grupo DD ocorreram na mesma região dos outros pacientes, com maior absorção nas bandas 1.658,5  $\text{cm}^{-1}$  (Amida, Proteínas/Ácido nucleico) e 1,564  $\text{cm}^{-1}$  (Ring base) quando comparado ao grupo controle. A tabela 3 mostra as bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos controle e DD.

**Figura 2:** Espectros médios do grupo controle e do grupo DD.

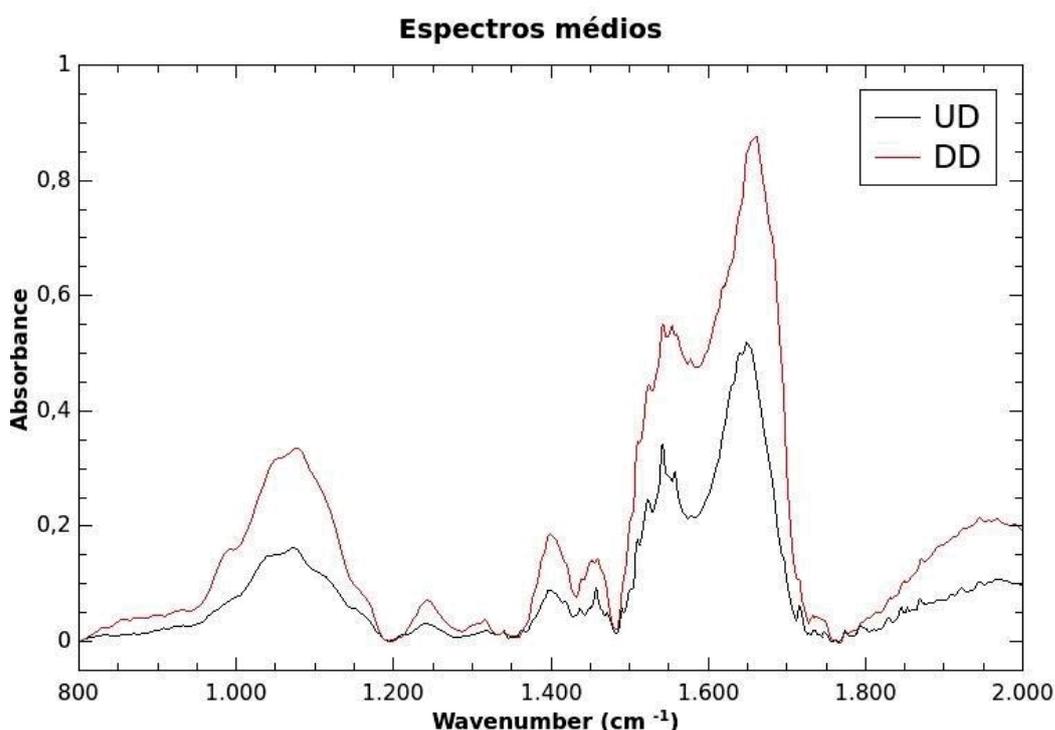


**Tabela 3:** Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos controle e DD.

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Controle	DD	Grupo Molecular
1.677,80	Alta	Baixa	Proteína (Amida II)
1.666,20	Alta	Baixa	Citocina e Timina
1.658,50	Baixa	Alta	Proteína
1.637,30	Alta	Baixa	Proteína
1.564,00	Baixa	Alta	Anel Aromático
1.087,70	Alta	Baixa	RNA, DNA
1.079,90	Alta	Baixa	RNA, DNA
1.054,90	Alta	Baixa	DNA/ IFN - $\gamma$
1.047,20	Alta	Baixa	Carboidratos; Glicogênio/ IFN - $\gamma$
1.035,60	Alta	Baixa	Glicogênio; Celulose

**FTIR - UD e DD**

Quando comparadas as análises dos dois grupos, foi observada uma maior absorção da banda 1.648,8 cm<sup>-1</sup> (Amida I/Proteínas) no grupo de pacientes que apresentaram DECH em apenas uma localização quando comparado ao grupo de apresentou DECH em mais de uma localização (figura 3). Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos DU e DD estão descritas na tabela 4.

**Figura 3:** Espectros médios dos grupos UD e DD.

**Tabela 4:** Bandas encontradas com diferenças de absorção entre os grupos DU e DD.

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	DD	UD	Grupo Molecular
1672	Alta	Baixa	Proteína
1662,3	Alta	Baixa	RNA
1654,6	Alta	Baixa	Proteína
1648,8	Baixa	Alta	Proteína
1641,1	Alta	Baixa	Proteína
1619,9	Alta	Baixa	Ácidos nucleicos
1604,5	Alta	Baixa	DNA
1591	Alta	Baixa	Proteína
1564	Alta	Baixa	Anel Aromático
1554,3	Alta	Baixa	Proteína
1542,8	Alta	Baixa	Proteína

## DISCUSSÃO

Entre os fatores de riscos associados ao desenvolvimento de DECH, destaca-se: doador feminino para receptor masculino, incompatibilidade de HLA, fonte de enxertando sangue periférico, alto número de células T infundidas, idade do receptor e sorologia positiva para CMV<sup>40</sup>. Nossos resultados corroboram com alguns destes fatores, entre eles a idade do receptor e a fonte de enxerto. A média de idade do grupo controle foi menor do que a do grupo DECH, sendo de 36,33 anos e 40,81 anos respectivamente. Quanto a fonte a fonte de células-tronco, o grupo controle teve apenas 14,82% dos transplantes realizados com sangue periférico, enquanto no grupo DECH 43,75% utilizou esta fonte de enxerto.

A técnica de FTIR utiliza pequenas quantidades de amostra para detectar os padrões de vibrações de diferentes moléculas através da absorção da luz Infravermelha. As diferentes frequências e intensidades das bandas do espectro infravermelho podem ser relacionados com composição de constituintes bioquímicos em amostras biológicas e seus grupos funcionais permitindo deduzir informações sobre a composição bioquímica da amostra e correlacionar com seus efeitos biológicos. As diferenças encontradas nesse estudo mostram uma diferença proteica em pacientes que apresentaram DECH após o TCTH.

As proteínas desempenham papel crucial na regulação e execução da resposta inflamatória, coordenando a resposta imunológica, combatendo patógenos,

limitando o dano aos tecidos e contribuindo para a homeostase. Um importante grupo de proteínas de regulação da resposta inflamatória são as citocinas, como as interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF), envolvidas em diferentes etapas do processo de inflamação como ativação e células do sistema imunológico<sup>41</sup>.

A medula óssea desempenha um papel fundamental na produção de células sanguíneas, através da diferenciação de células-tronco pluripotentes em diversas linhagens<sup>42</sup>. As citocinas são responsáveis por estimular o crescimento e desenvolvimento de várias colônias celulares na medula óssea<sup>43</sup>. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) desempenha um papel crucial como uma citocina inflamatória, ativando diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, linfócitos e células endoteliais. Além disso, o IFN- $\gamma$  estimula a apresentação de antígenos por macrófagos, induz a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC classe II) em células epiteliais intestinais, facilita a adesão e a ligação necessárias para a migração de leucócitos e impulsiona a atividade das células *natural killer*<sup>44</sup>. No ambiente microscópico de um tumor, o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) desempenha um papel essencial na coordenação tanto da resposta imune que promove o crescimento do tumor quanto da resposta imune que combate o tumor. O IFN- $\gamma$  atua como uma citocina citotóxica, trabalhando em conjunto com granzima B e perforina, a fim de iniciar o processo de apoptose em células cancerosas<sup>45,46</sup>.

A diminuição de níveis de citocinas pode ocorrer em pacientes que apresentam condições de imunossupressão ou outras doenças que possam impactar o sistema imunológico<sup>47</sup>. Em nosso trabalho, observa-se que os grupos controles apresentam maior absorção em bandas específicas para IFN- $\gamma$ , quando comparadas aos grupos com a doença. As bandas  $1.049\text{ cm}^{-1}$  e  $1.060\text{ cm}^{-1}$  do grupo controle, apresentaram maior absorção quando comparadas ao grupo com DECH em uma localização. O mesmo se observou nas bandas  $1.047\text{ cm}^{-1}$  e  $1.054\text{ cm}^{-1}$  do grupo controle quando comparado ao grupo com DECH em mais de uma localização.

Esse resultado pode ser explicado pela fisiopatologia da DECH, caracterizada pela hiperresponsividade do sistema imunológico adaptativo e redução dos reguladores das células imunes. Ocorre uma resposta imune às proteínas estranhas do MHC hospedeiro, o que resulta em uma regulação positiva das células Th1, Th2 e Th17

com uma redução nas células imunológicas reguladoras, como as células T reguladoras<sup>48</sup> onde o IFN- $\gamma$  atua.

A DECH é uma doença que tem um padrão autoimune, tanto na sua etiopatogenia, quanto em suas manifestações clínicas<sup>15,16,26</sup>. Vários trabalhos utilizaram a espectroscopia FTIR no diagnóstico de doenças autoimunes<sup>49-66</sup>. Tendo em vista a escassez de literatura sobre esse tema, o padrão da DECH ser semelhante a de outras doenças autoimunes e o crescente número de trabalhos utilizado o FTIR para análise destas doenças, nosso trabalho buscou avaliar uma possível identificação e correlação de bandas e características biomoleculares similares na DECH e em doenças imunomediadas.

A Esclerose Múltipla é uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso central e é causada pela ruptura da bainha de mielina dos axônios de neurônios. Essa ruptura é provocada por um processo inflamatório crônico mediado por linfócitos T ativado<sup>67,68</sup>. Yonar *et al.*, 2018<sup>51</sup> avaliaram o líquido Cefalorraquidiano de pacientes com Esclerose Múltipla, e apontaram que proporções diminuídas de amida I/amida II e lipídio/proteína, indica uma alteração no metabolismo lipídico proteico. Esses recursos podem ser usados como biomarcadores para esclerose múltipla. Além disso, relataram um alargamento da banda amida I em  $1654\text{ cm}^{-1}$ . Em 1995, Signorini *et al.*,<sup>52</sup> indicaram que o alargamento da banda amida I em  $1660\text{ cm}^{-1}$  é uma indicação de oxidação de proteínas. Apontando condições de estresse oxidativo que estão por trás da oxigenação de lipídios e proteínas em membrana de pacientes com esclerose múltipla. Além disso, pode ser um fator indicativo de inflamação. Em nosso trabalho, encontramos esse padrão, onde as bandas  $1656,5\text{ cm}^{-1}$  e  $1658,5\text{ cm}^{-1}$  tem uma absorção aumentada no grupo UD e no grupo DD quando comparadas ao grupo controle. Importante ressaltar que a DECH também pode se manifestar no sistema nervoso central<sup>15</sup>. Outro fato importante é que diversos estudos documentaram déficits neurológicos e descobertas de anormalidades em exames de ressonância magnética em pacientes que desenvolveram a DECH<sup>69-71</sup>. E em grande parte dos casos, manifestam-se síndromes que se assemelham à esclerose múltipla, encefalomielite disseminada aguda, mielite transversa, e outros sintomas inespecíficos, especialmente em associação com a DECH crônica<sup>72</sup>.

A principal doença autoimune que ocorre na pele é a psoríase. Trata-se de

um processo inflamatório crônico que envolve, principalmente, o estrato córneo. Essa inflamação é mediada por células da imunidade inata e adaptativa, onde células dendríticas e T infiltram-se na epiderme, produzindo citocinas que vão atuar nos queratinócitos e estimular a proliferação<sup>72,73</sup>. Alguns pesquisadores identificaram bandas específicas para psoríase através da análise da espectroscopia FTIR de saliva<sup>54,55</sup>. Pacientes com psoríase são identificados nas bandas  $1647\text{ cm}^{-1}$  e  $1545\text{ cm}^{-1}$ . Nosso trabalho encontrou esse padrão em  $1648,8\text{ cm}^{-1}$  em DU, quando comparada ao grupo DD, e em  $1542,8\text{ cm}^{-1}$  em DD, quando comparada ao grupo UD. Pullano et al., 2022<sup>55</sup>, apontou que a banda  $1608\text{ cm}^{-1}$  apresenta queda na absorção de mulheres com psoríase. Embora, nossa amostra não seja composta apenas pelo sexofeminino, encontramos a banda  $1.604,5\text{ cm}^{-1}$  apresenta esse padrão em DD quando comparada ao grupo UD.

A Doença Inflamatória Intestinal também é categorizada como uma doença autoimune e é caracterizada por episódios inflamatórios recorrentes, que estão associados a diarreia, sangramentos e cólicas abdominais. Essas inflamações, a longo prazo, podem provocar complicações como fístulas, abscessos e câncer colorretal<sup>74,75</sup>. A Doença Inflamatória Intestinal se manifesta principalmente como Colite Ulcerosa e Doença de Crohn<sup>75</sup>. A DECH e GVHD e a Doença Inflamatória Intestinal compartilham características semelhantes iniciais e de desenvolvimento, o que inclui danos ao tecido intestinal e perda da função de barreira intestinal. Além disso em ambas já o envolvimento de citocinas como os interferons tipo I e II<sup>76</sup>, incluindo o IFN- $\gamma$ , já citando anteriormente. Dois estudos apontaram que entre as bandas  $1620\text{ cm}^{-1}$  a  $1660\text{ cm}^{-1}$ , há uma assinatura relacionada à estrutura secundária da proteína que corresponde à amida I<sup>61,62</sup>. Esses dados correspondem à razão integral -hélice/folhas  $\beta$  foi observada em espectros séricos de animais com colite e humanos com colite ulcerosa<sup>63,77</sup>. A razão em animais com colite é sempre inferior ao controle<sup>78</sup>. Identificamos esse padrão em nossas amostras nas bandas  $1625\text{ cm}^{-1}$ ,  $1629\text{ cm}^{-1}$ ,  $1643\text{ cm}^{-1}$  do grupo UD, que apresenta menor absorção quando comparada ao grupo controle. O mesmo aconteceu em  $1637\text{ cm}^{-1}$  no grupo DD. E temos esse padrão também comparando os grupos UD x DD, as bandas

1619.9  $\text{cm}^{-1}$ , 1621  $\text{cm}^{-1}$ , 1654  $\text{cm}^{-1}$  e 1662  $\text{cm}^{-1}$  (DD) tiveram menor absorção do que o grupo UD, que apresentou apenas a banda 1648  $\text{cm}^{-1}$  com menor absorção. Esses dados merecem atenção, uma vez que a manifestação nos órgãos do sistema gastrointestinal, é muito comum em pacientes com DECH<sup>78</sup>, necessitando de novos estudos abordando essa temática.

Quanto à doença de Crohn, Prada et al., 2022<sup>79</sup> encontrou diferenças em amostras de plasma de pacientes com a doença e sem a doença. Nossos resultados se assemelham, onde encontramos as bandas 1564  $\text{cm}^{-1}$  aumentada em DD quando comparada ao grupo controle e UD, e 1591  $\text{cm}^{-1}$  aumentada em DD quando comparada a UD.

Já é descrito na literatura, os impactos da DECH no pâncreas, sendo a atrofia pancreática a mais relatada<sup>80,81</sup>. Essa condição está frequentemente associada a Diabetes tipo 1 e 2<sup>82</sup>. Neste contexto, encontramos resultados semelhantes com estudo que analisa Diabetes Mellitus tipo I. As bandas 1648  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I) e 1546  $\text{cm}^{-1}$  (Amida II) apresentam intensidade diminuída em pacientes com a doença<sup>83</sup>. Pacientes com manifestação de DECH em apenas uma região apresentaram bandas diminuídas em 1643  $\text{cm}^{-1}$  e 1547  $\text{cm}^{-1}$ , quando comparadas ao grupo controle e bandas 1648  $\text{cm}^{-1}$  e 1542  $\text{cm}^{-1}$  quando comparadas ao grupo DD.

Embora tenhamos encontrado um resultado que possa ser usado como modelo preditivo, é importante destacar que nosso trabalho enfrentou algumas limitações. A principal limitação é o número reduzido de amostras, uma vez que as coletas foram realizadas no período da pandemia por COVID - 19, o que fez com que os números de transplantes fossem drasticamente reduzidos. A escassez de trabalhos que abordem especificamente a temática da análise de bioquímica da saliva de pacientes com DECH também impactou a discussão de resultados. Além disso, a heterogeneidade de regiões das manifestões da doença pode ser uma limitação para entender possíveis diferenças da composição salivar quando há órgãos distintos comprometidos. Desta forma, reforça a necessidade de estudos com número amostral ampliado, para que se possa analisar se os resultados correspondem aos nossos achados.

## **Conclusão**

Este estudo apresentou resultados importantes no entendimento da DECH, sendo o primeiro trabalho na literatura acadêmica a analisar a composição bioquímica salivar de pacientes com a doença. Os resultados mostram a semelhança clínicas e bioquímica entre doenças autoimunes e a DECH. Nota-se uma diminuição de proteínas nos grupos com DECH. Reforça-se a necessidade de novos estudos com número amostral maior para o maior entendimento do perfil molecular da doença.

## Referências

1. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis, *Med. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(449).
2. Zhang C-Z, Cheng X-Q, Li J-Y, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016;8(3):133–7. <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.38>
3. Sun Y, Du W, Zhou C, Zhou Y, Cao Z, Tian Y, et al. Computational method for prediction of saliva-secretory proteins and its applications to identification of head and neck cancer biomarkers of salivary diagnosis. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2015;14:167–74.
4. Bonifacio A, Cervo S, Sergio V. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of biofluids: fundamental aspects and diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(27):8265–77. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8697-z>
5. Bandeira CCS, Madureira KCR, Rossi MB, Gallo JF, da Silva APMA, Torres VL, et al. Micro-Fourier-transform infrared reflectance spectroscopy as tool for probing IgG glycosylation in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2022;12(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-08156-6>
6. Song M, Bai H, Zhang P, Zhou X, Ying B. Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics. *Int J Oral Sci*. 2023;15(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-022-00209-w>
7. Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168(6):1718–27. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9891-5>
8. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009;22(4):241–8.
9. Farah R, Haraty H, Salame Z, Fares Y, Ojcius DM, Said Sadier N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Biomed J*. 2018;41(2):63–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.004>
10. Liu X, Yu H, Qiao Y, Yang J, Shu J, Zhang J, et al. Salivary glycoproteins as potential biomarkers for screening of early-stage breast cancer. *EBioMedicine*. 2018;28:70–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.026>
11. Shah S. Salivaomics: The current scenario. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(3):375–81. [http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_171\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_171_18)
12. Gug IT, Tertis M, Hosu O, Cristea C. Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview. *Trends Analyt Chem*. 2019;113:301–16 <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.020>

13. Riddell SR, Appelbaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med.* 2007;4(7):e198. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040198>
14. Jenq RR & van den Brink MR Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature reviews Cancer.* 2010;10:213–21.
15. Zeiser R, Teshima T. Nonclassical manifestations of acute GVHD. *Blood.* 2021;138(22):2165–72. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2021012431>
16. Zeiser A, Blazar R. Acute graft-versus-host disease: biological process, prevention and therapy. *N Engl J Med.* 2017;377(22):2167–79.
17. Shimoji S, Hashimoto D, Tsujigiwa H, Miyawaki K, Kato K, Takahashi S, et al. Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in mice. *Blood.* 2017;129(9):1216–25. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-07-728337>
18. Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(5):283–95. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.10>
19. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. *Blood.* 1986;68(3):770–3. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v68.3.770.770>
20. Ferrara J, Deeg HJ, Burakoff S. Graft versus host disease. New York: Marcell Dekker; 1997.
21. Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol.* 2003;21(4):149–61. <http://dx.doi.org/10.1002/hon.716>
22. Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease: Review. *Br J Haematol.* 2004;125(4):435–54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04945.x>
23. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-A- matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295–304. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-197410000-00001>
24. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008;21(2):101–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2008.02.005>
25. Hansen JA, Anasetti C, Beatty PG, Martin PJ, Sanders JE, Storb R, et al. Treatment of leukemia by marrow transplantation from HLA incompatible donors. Effect of HLA- disparity on GVHD, relapse and survival. *Bone Marrow Transplant.*

1990;6 Suppl 1:108–11.

26. Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrowtransplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(9):873–81. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1701437>
27. Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of graft-versus-host disease. *Dermatol Clin.* 2019;37(4):569–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2019.05.014>
28. Verma K, Akhtar MJ, Anchliya A. Combination of FTIR Spectroscopy and Chemometric Method on Quantitative Approach - A Review. *Austin J Anal Pharm Chem.* 2021;8(1).
29. Jermyn M, Mok K, Mercier J, Desroches J, Pichette J, Saint-Arnaud K, et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci TranslMed.* 2015;7(274). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2384>
30. Zapata F, Fernández de la Ossa MÁ, García-Ruiz C. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *Trends Analyt Chem.* 2015;64:53–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.011>
31. Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, et al. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. *J Oncol.* 2020;2020:1–11. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4343590>
32. Alkhuder K. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: a universal analytical technique with promising applications in forensic analyses. *Int J Legal Med.* 2022;136(6):1717–36. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-022-02882-2>
33. Zheng X, Lv G, Du G, Zhai Z, Mo J, Lv X. Rapid and low-cost detection of thyroid dysfunction using Raman spectroscopy and an improved support vector machine. *IEEE Photonics J.* 2018;10(6):1–12. <http://dx.doi.org/10.1109/jphot.2018.2876686>
34. Yang H, Yang S, Kong J, Dong A, Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *NatProtoc.* 2015;10(3):382–96. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
35. Lin D, Qiu S, Huang W, Pan J, Xu Z, Chen R, et al. Autofluorescence and white light imaging-guided endoscopic Raman and diffuse reflectance spectroscopy for in vivo nasopharyngeal cancer detection. *J Biophotonics.* 2018;11(4). <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700251>
36. Mitropoulos K, Katsila T, Patrinos GP, Pampalakis G. Multi-omics for biomarker discovery and target validation in biofluids for amyotrophic lateral sclerosis diagnosis. *OMICS.* 2018;22(1):52–64. <http://dx.doi.org/10.1089/omi.2017.0183>

37. Morais CLM, Lima KMG, Singh M, Martin FL. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. *Nat Protoc.* 2020;15(7):2143–62. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-0322-8>
38. Ogruc Ildiz G, Arslan M, Unsalan O, Araujo-Andrade C, Kurt E, Karatepe HT, et al. FT-IR spectroscopy and multivariate analysis as an auxiliary tool for diagnosis of mental disorders: Bipolar and schizophrenia cases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;152:551–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.114>
39. Udi Z, Eyal B, Omri B. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study. *BMC Cancer.* 2015;15.
40. Kok LMC, Bungener L, de Bock GH, Biswana A, van der Wal G, van Imhoff GW, et al. Risk factors associated with the development of moderate to severe chronic graft-versus-host disease after non-myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation in patients with AML or MDS. *Hum Cell.* 2020;33(1):243–51. <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-019-00297-7>
41. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9(6):7204–18. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
42. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28 Suppl 3:C2-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>
43. Cronkite DA, Strutt TM. The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes. *J Immunol Res.* 2018; 2018:1–14. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1467538>
44. Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):103–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.10.011>
45. Tau GZ, Cowan SN, Weisburg J, Braunstein NS, Rothman PB. Regulation of IFN- $\gamma$  signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 2001;
46. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8<sup>+</sup> T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>
47. Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun.* 2018;87:38–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004>
48. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2565–79. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1703472>

49. El Khoury Y, Collongues N, De Sèze J, Gulsari V, Patte-Mensah C, Marcou G, et al. Serum-based differentiation between multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis by Random Forest classification of FTIR spectra. *Analyst*. 2019;144(15):4647–52. <http://dx.doi.org/10.1039/c9an00754g>
50. El Khoury Y, Gebelin M, de Sèze J, Patte-Mensah C, Marcou G, Varnek A, et al. Rapid discrimination of neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis using machine learning on infrared spectra of Sera. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2791. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23052791>
51. Yonar D, Ocek L, Tiftikcioglu BI, Zorlu Y, Severcan F. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis diagnosis from cerebrospinal fluids via Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19303-3>
52. Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett*. 1995;362(2):165–70. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00235-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)00235-2)
53. Rodrigues JFS, da Silva LCM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Lückemeyer DD, Henrique AS, et al. Monitoring of peripheral blood leukocytes and plasma samples: Pilot study to examine treatment response to leflunomide in rheumatoid arthritis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(2):106. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14020106>
54. Bottoni U, Tiriolo R, Pullano SA, Dastoli S, Amoruso GF, Nisticò SP, et al. Infrared saliva analysis of psoriatic and diabetic patients: Similarities in protein components. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2016;63(2):379–84. <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2015.2458967>
55. Pullano SA, Bianco MG, Greco M, Mazzuca D, Nisticò SP, Fiorillo AS. FT-IR saliva analysis for the diagnosis of psoriasis: A pilot study. *Biomed Signal Process Control*. 2022;74(103525):103525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bspc.2022.103525>
56. da Silva JB, de Carvalho AEV, Schneider C, Corbellini VA. Saliva may predict quality of life in psoriasis as measured by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;39(103017):103017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103017>
57. Takahashi H, Tsuji H, Minami-Hori M, Miyauchi Y, Iizuka H. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. *J Dermatol*. 2014;41(2):144–8. <http://dx.doi.org/10.1111/1346-8138.12393>
58. Keung C, Heraud P, Kuk N, Lim R, Sievert W, Moore G. Fourier Transform Infra-Red Microspectroscopy Can Accurately Diagnose Colitis and Assess Severity of Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23.
59. Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Erwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin

10- deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease: Interleukin 10- deficient colitis. *Br J Surg.* 2000;87(10):1346–51. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2168.2000.01615.x>

60. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp.* 2012;(60). <http://dx.doi.org/10.3791/3678-v>

61. Titus J, Ghimire H, Viennois E, Merlin D, Unil Perera AG. Protein secondary structure analysis of dried blood serum using infrared spectroscopy to identify markers for colitis screening. *J Biophotonics.* 2018;11(3):e201700057. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700057>

62. Titus J, Viennois E, Merlin D. Unil Perera, Minimally invasive screening for colitis using attenuated total internal reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *J Biophotonics.* 2017;10:465–72.

63. Ghimire H, Viennois E, Hu X, Qin G, Merlin D, Perera AGU. Infrared spectrometric biomarkers for ulcerative colitis screening using human serum samples. *J Biophotonics.* 2022;15(6):e202100307 <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.202100307>

64. Alkhuder K. Fourier-transform infrared spectroscopy: A universal optical sensing technique with auspicious application prospects in the diagnosis and management of autoimmune diseases. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023;42(103606):103606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103606>

65. Nogueira MS, Barreto AL, Furukawa M, Rovai ES, Bastos A, Bertoncetto G, et al. FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40(103036):103036. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103036>

66. Scott DA, Renaud DE, Krishnasamy S, Meriç P, Buduneli N, Çetinkalp Ş, et al. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1). <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-2-48>

67. Barcelos IP de, Troxell RM, Graves JS. Mitochondrial dysfunction and multiple sclerosis. *Biology (Basel).* 2019;8(2):37. <http://dx.doi.org/10.3390/biology8020037>

68. Kuerten S, Lanz TV, Lingampalli N, Lahey LJ, Kleinschnitz C, Mäurer M, et al. Autoantibodies against central nervous system antigens in a subset of B cell–dominant multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(35):21512–8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2011249117>

69. Kamble RT, Chang C-C, Sanchez S, Carrum G. Central nervous system graft-versus-host disease: report of two cases and literature review. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(1):49–52. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705540>

70. Ruggiu M, Cuccuini W, Mokhtari K, Meignin V, Peffault de Latour R, Robin M,

et al. Case report: Central nervous system involvement of human graft versus host disease Report of 7 cases and a review of literature. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(42):e8303. <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000008303>

71. Mathew NR, Vinnakota JM, Apostolova P, Erny D, Hamarsheh S, Andrieux G, et al. Graft-versus-host disease of the CNS is mediated by TNF upregulation in microglia. *J Clin Invest* 2020;130(3):1315–29. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI1130272>

72. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1475. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20061475>

73. Singh R, Koppu S, Perche PO, Feldman SR. The cytokine mediated molecular pathophysiology of psoriasis and its clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12793. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312793>

74. Petagna L, Antonelli A, Ganini C, Bellato V, Campanelli M, Divizia A, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol Direct*. 2020;15(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13062-020-00280-5>

75. Wark G, Samocha-Bonet D, Ghaly S, Danta M. The role of diet in the pathogenesis and management of inflammatory bowel disease: A review. *Nutrients*. 2020;13(1):135. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13010135>

76. Haring E, Zeiser R, Apostolova P. Interfering with inflammation: Heterogeneous effects of interferons in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2021;12. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.705342>

77. Ghimire H, Hu X, Qin G, Unil Perera AG. Optimizing infrared spectral discrimination to enhance disease diagnostics: monitoring the signatures of inflammatory bowel diseases with anti-TNF $\alpha$  therapy. *Biomed Opt Express*. 2020;11(8):4679. <http://dx.doi.org/10.1364/boe.394895>

78. Naymagon S, Naymagon L, Wong S-Y, Ko HM, Renteria A, Levine J, et al. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(12):711–26. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.126>

79. Prada P, Brunel B, Moulin D, Rouillon L, Netter P, Loeuille D, et al. Identification of circulating biomarkers of Crohn's disease and spondyloarthritis using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biophotonics*. 2023;16(2). <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.202200200>

80. Okada Y, Nakasone H, Nakamura Y, Kawamura M, Kawamura S, Takeshita J, et al. Pancreatic atrophy and recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Gastroenterol*. 2022;57(8):571–80. <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-022-01881-9>

81. López Cardona J, Senosiaín Lalastra C, Mesonero Gismero F, García de la Fila Molina I, Escribano Cruz S, Trigo Gallego G, et al. Exocrine pancreatic insufficiency and graft-versus-host disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2022. <http://dx.doi.org/10.17235/reed.2022.9143/2022>
82. Radlinger B, Ramoser G, Kaser S. Exocrine pancreatic insufficiency in type 1 and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2020;20(6). <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-020-01304-0>
83. Šťovíčková L, Tatarkovič M, Logerová H, Vavřinec J, Setnička V. Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst.* 2015;140(7):2266–72. <http://dx.doi.org/10.1039/c4an01874e>

#### **4. CONCLUSÃO**

Este estudo apresentou resultados importantes para o entendimento da DECH, uma vez que foi o primeiro trabalho na literatura acadêmica a analisar a composição bioquímica da saliva de pacientes que desenvolveram a doença. Esses resultados mostram a semelhança, não apenas clínica, mas também de metabólitos, entre doenças autoimunes e a DECH. Nota-se uma diminuição de proteínas nos grupos com DECH, quando comparada aos que não apresentavam a doença. Reforça-se a necessidade de novos estudos com número amostral maior, para que se possa melhorar o diagnóstico da DECH, bem como o tratamento e, possivelmente, o número de morbidade e mortalidade provocados pela doença.

## 5. REFERÊNCIAS

Alkhuder K. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: a universal analytical technique with promising applications in forensic analyses. *Int J Legal Med.* 2022;136(6):1717–36. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-022-02882-2>

Alkhuder K. Fourier-transform infrared spectroscopy: A universal optical sensing technique with auspicious application prospects in the diagnosis and management of autoimmune diseases. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023;42(103606):103606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103606>

Bandeira CCS, Madureira KCR, Rossi MB, Gallo JF, da Silva APMA, Torres VL, et al. Micro-Fourier-transform infrared reflectance spectroscopy as tool for probing IgG glycosylation in COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2022;12(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-08156-6>

Barcelos IP de, Troxell RM, Graves JS. Mitochondrial dysfunction and multiple sclerosis. *Biology (Basel).* 2019;8(2):37. <http://dx.doi.org/10.3390/biology8020037>

Blasiak P, Simonetta K, Vargas F, Chalandon MI. Central nervous system graft-versus-host disease (CNS-GvHD) after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *BMJ Case Rep.* 2018;

Bonifacio A, Cervo S, Sergio V. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of biofluids: fundamental aspects and diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(27):8265–77. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8697-z>

Bottoni U, Tiriolo R, Pullano SA, Dastoli S, Amoruso GF, Nisticò SP, et al. Infrared saliva analysis of psoriatic and diabetic patients: Similarities in

protein components. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2016;63(2):379–84. <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2015.2458967>

Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):103–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.10.011>

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9(6):7204–18. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

Chou S-Y, Yu C-C, Yen Y-T, Lin K-T, Chen H-L, Su W-F. Romantic story or Raman scattering? Rose petals as ecofriendly, low-cost substrates for ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem.* 2015;87(12):6017–24. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00551>

Cronkite DA, Strutt TM. The regulation of inflammation by innate and adaptive lymphocytes. *J Immunol Res.* 2018; 2018:1–14. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1467538>

da Silva JB, de Carvalho AEV, Schneider C, Corbellini VA. Saliva may predict quality of life in psoriasis as measured by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;39(103017):103017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103017>

El Khoury Y, Collongues N, De Sèze J, Gulsari V, Patte-Mensah C, Marcou G, et al. Serum-based differentiation between multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis by Random Forest classification of FTIR spectra. *Analyst.* 2019;144(15):4647–52. <http://dx.doi.org/10.1039/c9an00754g>

El Khoury Y, Gebelin M, de Sèze J, Patte-Mensah C, Marcou G, Varnek

A, et al. Rapid discrimination of neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis using machine learning on infrared spectra of Sera. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2791. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23052791>

Farah R, Haraty H, Salame Z, Fares Y, Ojcius DM, Said Sadier N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Biomed J.* 2018;41(2):63–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.004>

Ferrara J, Deeg HJ, Burakoff S. *Graft versus host disease.* New York: Marcell Dekker; 1997.

Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, et al. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. *J Oncol.* 2020;2020:1–11. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4343590>

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.09.004>

Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 2011;117(11):3214–9. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-08-302109>

Ghimire H, Hu X, Qin G, Unil Perera AG. Optimizing infrared spectral discrimination to enhance disease diagnostics: monitoring the signatures of inflammatory bowel diseases with anti-TNF $\alpha$  therapy. *Biomed Opt Express.* 2020;11(8):4679. <http://dx.doi.org/10.1364/boe.394895>

Ghimire H, Viennois E, Hu X, Qin G, Merlin D, Perera AGU. Infrared spectrometric biomarkers for ulcerative colitis screening using human serum samples. *J Biophotonics*. 2022;15(6):e202100307 <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.202100307>

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18(4):295–304. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-197410000-00001>

Grube M, Holler E, Weber D, Holler B, Herr W, Wolff D. Risk factors and outcome of chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation—results from a single-center observational study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(10):1781–91: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.06.020>

Gug IT, Tertis M, Hosu O, Cristea C. Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview. *Trends Analyt Chem*. 2019;113:301–16 <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.020>

Hansen JA, Anasetti C, Beatty PG, Martin PJ, Sanders JE, Storb R, et al. Treatment of leukemia by marrow transplantation from HLA incompatible donors. Effect of HLA-disparity on GVHD, relapse and survival. *Bone Marrow Transplant*. 1990;6 Suppl 1:108–11.

Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease: Review. *Br J Haematol*. 2004;125(4):435–54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04945.x>

Jagasia MH, Greinix HT, Arora M. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group

report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(3):389–401.

Jenq RR & van den Brink MR Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2010;10:213–21.

Jermyn M, Mok K, Mercier J, Desroches J, Pichette J, Saint-Arnaud K, et al. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci Transl Med*. 2015;7(274). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2384>

Kamble RT, Chang C-C, Sanchez S, Carrum G. Central nervous system graft-versus-host disease: report of two cases and literature review. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(1):49–52. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705540>

Haring E, Zeiser R, Apostolova P. Interfering with inflammation: Heterogeneous effects of interferons in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2021;12. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.705342>

Katukuri VK, Hargrove J, Miller SJ, Rahal K, Kao JY, Wolters R, et al. Detection of colonic inflammation with Fourier transform infrared spectroscopy using a flexible silver halide fiber. *Biomed Opt Express*. 2010;1(3):1014. <http://dx.doi.org/10.1364/boe.1.001014>

Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K, Erwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease: Interleukin 10-deficient colitis. *Br J Surg*. 2000;87(10):1346–51. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2168.2000.01615.x>

Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ.

Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*. 1986;68(3):770–3: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v68.3.770.770>

Keung C, Heraud P, Kuk N, Lim R, Sievert W, Moore G. Fourier Transform Infra-Red Microspectroscopy Can Accurately Diagnose Colitis and Assess Severity of Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23.

Kew AK, Macaulay R, Burrell S, Rubin S, Dow G, Couban S. Central nervous system graft-versus-host disease presenting with granulomatous encephalitis. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(2):183–4. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705709>

Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*. 2012;(60). <http://dx.doi.org/10.3791/3678-v>

Kok LMC, Bungener L, de Bock GH, Biswana A, van der Wal G, van Imhoff GW, et al. Risk factors associated with the development of moderate to severe chronic graft-versus-host disease after non-myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation in patients with AML or MDS. *Hum Cell*. 2020;33(1):243–51. <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-019-00297-7>

Kuerten S, Lanz TV, Lingampalli N, Lahey LJ, Kleinschnitz C, Mäurer M, et al. Autoantibodies against central nervous system antigens in a subset of B cell–dominant multiple sclerosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(35):21512–8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2011249117>

Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(4):215–33. <http://dx.doi.org/10.1053/bbmt.2003.50026>

Lee Y-H, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of

diseases. *Am J Dent*. 2009;22(4):241–8.

Lin D, Qiu S, Huang W, Pan J, Xu Z, Chen R, et al. Autofluorescence and white light imaging-guided endoscopic Raman and diffuse reflectance spectroscopy for in vivo nasopharyngeal cancer detection. *J Biophotonics*. 2018;11(4). <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700251>

Liu X, Yu H, Qiao Y, Yang J, Shu J, Zhang J, et al. Salivary glycoproteins as potential biomarkers for screening of early-stage breast cancer. *EBioMedicine*. 2018;28:70–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.026>

López Cardona J, Senosiain Lalastra C, Mesonero Gismero F, García de la Filia Molina I, Escribano Cruz S, Trigo Gallego G, et al. Exocrine pancreatic insufficiency and graft-versus-host disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2022. <http://dx.doi.org/10.17235/reed.2022.9143/2022>

Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis, *Med. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(449).

Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>

Mathew NR, Vinnakota JM, Apostolova P, Erny D, Hamarsheh S, Andrieux G, et al. Graft-versus-host disease of the CNS is mediated by TNF upregulation in microglia. *J Clin Invest* 2020;130(3):1315–29. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI130272>

Mitropoulos K, Katsila T, Patrinos GP, Pampalakis G. Multi-omics for biomarker discovery and target validation in biofluids for amyotrophic lateral sclerosis diagnosis. *OMICS*. 2018;22(1):52–64. <http://dx.doi.org/10.1089/omi.2017.0183>

Morais CLM, Lima KMG, Singh M, Martin FL. Tutorial: multivariate classification for vibrational spectroscopy in biological samples. *Nat Protoc.* 2020;15(7):2143–62. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-0322-8>

Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28 Suppl 3:C2-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>

Naymagon S, Naymagon L, Wong S-Y, Ko HM, Renteria A, Levine J, et al. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(12):711–26. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.126>

Nogueira MS, Barreto AL, Furukawa M, Rovai ES, Bastos A, Bertoncetto G, et al. FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40(103036):103036. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103036>

Ogruc Ildiz G, Arslan M, Unsalan O, Araujo-Andrade C, Kurt E, Karatepe HT, et al. FT-IR spectroscopy and multivariate analysis as an auxiliary tool for diagnosis of mental disorders: Bipolar and schizophrenia cases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;152:551–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.114>

Okada Y, Nakasone H, Nakamura Y, Kawamura M, Kawamura S, Takeshita J, et al. Pancreatic atrophy and recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Gastroenterol.* 2022;57(8):571–80. <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-022-01881-9>

Petagna L, Antonelli A, Ganini C, Bellato V, Campanelli M, Divizia A, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol Direct.* 2020;15(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13062-020-00280-5>

Prada P, Brunel B, Moulin D, Rouillon L, Netter P, Loeuille D, et al. Identification of circulating biomarkers of Crohn's disease and spondyloarthritis using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biophotonics*. 2023;16(2). <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.202200200>

Pullano SA, Bianco MG, Greco M, Mazzuca D, Nisticò SP, Fiorillo AS. FT-IR saliva analysis for the diagnosis of psoriasis: A pilot study. *Biomed Signal Process Control*. 2022;74(103525):103525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bspc.2022.103525>

Ramachandran V, Kolli SS, Strowd LC. Review of graft-versus-host disease. *Dermatol Clin*. 2019;37(4):569–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2019.05.014>

Radlinger B, Ramoser G, Kaser S. Exocrine pancreatic insufficiency in type 1 and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2020;20(6). <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-020-01304-0>

Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol*. 2003;21(4):149–61. <http://dx.doi.org/10.1002/hon.716>

Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1475. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20061475>

Riddell SR, Appelbaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med*. 2007;4(7):e198. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040198>

Rodrigues JFS, da Silva LCM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Lückemeyer DD, Henrique AS, et al. Monitoring of peripheral blood leukocytes and plasma samples: A pilot study to examine treatment response to leflunomide in rheumatoid arthritis. *Pharmaceuticals (Basel)*.

2021;14(2):106. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14020106>

Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Gluckman E, Abuaf N, Combrisson A. Autoimmunity in 28 patients after allogeneic bone marrow transplantation: comparison with Sjögren syndrome and scleroderma. *Br J Haematol.* 1987;66(1):45–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1987.tb06888.x>

Rouquette-Gally AM, Boyeldieu D, Prost AC, Gluckman E. Autoimmunity after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 53 long-term-surviving patients. *Transplantation.* 1988;46(2):238–40. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-198808000-00010>

Ruggiu M, Cucuini W, Mokhtari K, Meignin V, Peffault de Latour R, Robin M, et al. Case report: Central nervous system involvement of human graft versus host disease Report of 7 cases and a review of literature. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(42):e8303. <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000008303>

Schmitz N. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood.* 2002;100(3):761–7. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2001-12-0304>

Scott DA, Renaud DE, Krishnasamy S, Meriç P, Buduneli N, Çetinkalp Ş, et al. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1). <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-2-48>

Shah S. Salivaomics: The current scenario. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018;22(3):375–81. [http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_171\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_171_18)

Sherer Y, Shoenfeld Y. Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(9):873–81. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1701437>

Shimoji S, Hashimoto D, Tsujigiwa H, Miyawaki K, Kato K, Takahashi S, et al. Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in mice. *Blood*. 2017;129(9):1216–25. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-07-728337>

Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010;115(26):5401–11. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-11-253559>

Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):283–95. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.10>

Shortt J, Hutton E, Faragher M, Spencer A. Central nervous system graft-versus-host disease post allogeneic stem cell transplant. *Br J Haematol*. 2006;132(2):245–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05864.x>

Signorini C, Ferrali M, Ciccoli L, Sugherini L, Magnani A, Comporti M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett*. 1995;362(2):165–70. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00235-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)00235-2)

Singh R, Koppu S, Perche PO, Feldman SR. The cytokine mediated molecular pathophysiology of psoriasis and its clinical implications. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12793. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312793>

Song M, Bai H, Zhang P, Zhou X, Ying B. Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics. *Int J Oral Sci*. 2023;15(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-022-00209-w>

Štovičková L, Tatarkovič M, Logerová H, Vavřinec J, Setnička V.

Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst*. 2015;140(7):2266–72. <http://dx.doi.org/10.1039/c4an01874e>

Sun Y, Du W, Zhou C, Zhou Y, Cao Z, Tian Y, et al. Computational method for predict of saliva-secreting proteins and its applications to identification of head and neck cancer biomarkers of salivary diagnosis. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2015;14:167–74.

Takahashi H, Tsuji H, Minami-Hori M, Miyauchi Y, Iizuka H. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. *J Dermatol*. 2014;41(2):144–8. <http://dx.doi.org/10.1111/1346-8138.12393>

Tau GZ, Cowan SN, Weisburg J, Braunstein NS, Rothman PB. Regulation of IFN- $\gamma$  signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8+ T cells. *J Immunol*. 2001;

Titus J, Ghimire H, Viennois E, Merlin D, Unil Perera AG. Protein secondary structure analysis of dried blood serum using infrared spectroscopy to identify markers for colitis screening. *J Biophotonics*. 2018;11(3):e201700057. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700057>

Titus J, Viennois E, Merlin D, Unil Perera, Minimally invasive screening for colitis using attenuated total internal reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *J Biophotonics*. 2017;10:465–72.

Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(2):101–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2008.02.005>

Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun*.

2018;87:38–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004>

Udi Z, Eyal B, Omri B. Early detection of breast cancer using total biochemical analysis of peripheral blood components: a preliminary study. *BMC Cancer*. 2015;15.

Verma K, Akhtar MJ, Anchliya A. Combination of FTIR Spectroscopy and Chemometric Method on Quantitative Approach - A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*. 2021;8(1).

Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015;7(293):293ra104. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8507>

Wark G, Samocha-Bonet D, Ghaly S, Danta M. The role of diet in the pathogenesis and management of inflammatory bowel disease: A review. *Nutrients*. 2020;13(1):135. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13010135>

Yang H, Yang S, Kong J, Dong A, Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat Protoc*. 2015;10(3):382–96. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.024>

Yonar D, Ocek L, Tiftikcioglu BI, Zorlu Y, Severcan F. Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis diagnosis from cerebrospinal fluids via Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19303-3>

Zapata F, Fernández de la Ossa MÁ, García-Ruiz C. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *Trends Analyt Chem*. 2015; 64 :53–63.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.011>

Zeiser R, Teshima T. Nonclassical manifestations of acute GVHD. *Blood*. 2021;138(22):2165–72. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2021012431>

Zeiser A, Blazar R. Acute graft-versus-host disease: biological process, prevention and therapy. *N Engl J Med*. 2017;377(22):2167–79.

Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2565–79. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1703472>

Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168(6):1718–27. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9891-5>

Zhang C-Z, Cheng X-Q, Li J-Y, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016;8(3):133–7. <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2016.38>

Zheng X, Lv G, Du G, Zhai Z, Mo J, Lv X. Rapid and low-cost detection of thyroid dysfunction using Raman spectroscopy and an improved support vector machine. *IEEE Photonics J*. 2018;10(6):1–12. <http://dx.doi.org/10.1109/jphot.2018.2876686>

## APÊNDICE 1 – Artigos publicados ao longo do curso de Pós –Graduação/Doutorado

ARTIGO  
DE OPINIÃO

Recebido: 16/06/2021  
Aceito: 22/07/2021

# Desafio dos pesquisadores brasileiros da área da saúde no cenário pandêmico da COVID-19

Challenge of Brazilian health researchers in the COVID-19 pandemic scenario

Stephanie von Stein Cubas **Warnavin**<sup>1</sup>, Rafael Zancan **Mobile**<sup>1</sup>, Juliana Lucena **Schussel**<sup>1</sup> 

**RESUMO** | Os avanços na ciência brasileira alcançaram a 13ª posição na produção científica mundial, e, em 2020, o Brasil foi responsável por 2,39% da produção científica mundial, alcançando a 11ª posição entre os países que mais publicaram sobre a COVID-19. O objetivo deste trabalho foi contribuir e refletir sobre o debate dos pesquisadores e pós-graduandos da área de saúde no cenário pandêmico da COVID-19. A pandemia da COVID-19 evidenciou a importância da ciência no desfecho de políticas públicas e a fragilidade do sistema de pesquisa no Brasil, em que a maior força de trabalho se concentra em pós-graduandos, que muitas vezes não possuem condições ideais de trabalho e não estão inseridos nos planos de resposta às emergências globais de saúde pública. Este texto traz uma reflexão e problematização sobre o papel dos pesquisadores e pós-graduandos em saúde e reforça a importância de discutir a atuação de pesquisadores/cientistas em um período de grandes incertezas na sociedade.

**Palavras-chave** | COVID-19; pesquisadores; trabalhador da saúde.

**ABSTRACT** | Advances in Brazilian science made the country reach the 13th position in the world scientific production, and, in 2020, Brazil was responsible for 2.39% of the world scientific production, reaching the 11th position among the countries that most published about COVID-19. The aim of this study was to contribute to and reflect on the issue of health researchers and graduate students in the scenario of COVID-19 pandemic. This pandemic highlighted the importance of science in the outcome of public policies and the fragility of the research system in Brazil, where the workforce is mainly composed of graduate students, who often do not have ideal working conditions and are not included in the response plans to global public health emergencies. This text brings a reflection and a questioning on the role of health researchers and graduate students and reinforces the importance of discussing the work of researchers/scientists in a period of great uncertainty in society.

**Keywords** | COVID-19; researchers; health personnel.

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia, Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Conflitos de interesse: Nenhum.

**Como citar:** Warnavin SSC, Mobile RZ, Schussel JL. Challenge of Brazilian health researchers in COVID-19 pandemic scenario. Rev Bras Med Trab. 2022;20(4):685-690. <http://dx.doi.org/10.47626/1679-4435-2022-830>

**SARS-CoV-2 in saliva, viremia and seroprevalence for COVID-19 surveillance at a single hematopoietic stem cell transplantation center: a prospective cohort study**

Rafael Zancan Mobile<sup>1</sup>, Stephanie von Stein Cubas Warnawin<sup>1</sup>, Teresinha Keiko Kojo<sup>2,3</sup>, Jéssica Aline Pereira Rodrigues<sup>2,3</sup>, Adriana Mendes de Quadros Cavilha<sup>2,3</sup>, Rodrigo Melim Zerbinati<sup>4</sup>, Douglas Adamoski<sup>5</sup>, Jaqueline Carvalho de Oliveira<sup>5</sup>, Marcelo Santos Conzentino<sup>6</sup>, Luciano Fernandes Huergo<sup>5</sup>, Daniela Fiori Gradia<sup>5</sup>, Paulo Henrique Braz-Silva<sup>4,7</sup>, Juliana Lucena Schussel<sup>1,2</sup>

**ABSTRACT**

This prospective cohort study aims to analyze the surveillance of COVID-19 at a single hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) center in Brazil, in 29 patients undergoing allogeneic HSCT and 57 healthcare workers (nurses and dentists), through viral shedding of SARS-CoV-2 in saliva and plasma and seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG. In addition, we report two cases with prolonged persistent detection of SARS-CoV-2 without seroconversion. The sample collection was performed seven times for patients and five times for healthcare workers. Only two patients tested positive for SARS-CoV-2 in their saliva and plasma samples (6.9%) without seroconversion. All healthcare workers were asymptomatic and none tested positive. Two patients (6.9%) and four nurses (8%) had positive serology. No dentists had positive viral detection or positive serology. Our results reflect a low prevalence of positive RT-PCR and seroprevalence of SARS-CoV-2 in patients and healthcare workers at a single HSCT center. Results have also corroborated how the rigorous protocols adopted in transplant centers were even more strengthened in this pandemic scenario.

**KEYWORDS:** COVID-19. SARS-CoV-2. Hematopoietic stem cell transplantation. Healthcare workers.

**INTRODUCTION**

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is considered a complex and aggressive procedure and demands specific care from a multidisciplinary team working in the same therapeutic context. Complications of treatment should be closely observed to avoid life-threatening problems or conditions that affect the survival and quality of life of patients<sup>1</sup>.

HSCT recipients are at an increased risk for viral infections due to underlying disease and immunosuppression. Respiratory viral infections are prevalent before and post-HSCT<sup>2,3</sup>. Most patients develop upper and lower respiratory tract infections, with an average mortality rate of 32%<sup>4-6</sup>. In addition, prolonged neutropenia and lymphopenia, as well as graft-versus-host disease (GVHD), increase the risk of viral infections and these patients often have prolonged viral shedding. The initial laboratory evaluation of these patients for COVID-19 (Coronavirus disease 2019) is part of the protocol for monitoring active infection and management during the pandemic<sup>7,8</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Estomatologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná, Complexo Hospital de Clínicas, Programa de Residência Multiprofissional em Oncologia e Hematologia, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná, Complexo Hospital de Clínicas, Serviço de Transplante de Medula Óssea, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>6</sup>Universidade Federal do Paraná, Setor Litoral, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>7</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, Departamento de Estomatologia, São Paulo, São Paulo, Brazil

**Correspondence to:** Juliana Lucena Schussel  
Universidade Federal do Paraná,  
Departamento de Estomatologia, Av.  
Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico,  
CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brazil  
Tel: +55 41 3360-4024, Fax: +55 41  
33604053

**E-mail:** [juliana.schussel@ufpr.br](mailto:juliana.schussel@ufpr.br)

**Received:** 19 January 2022

**CAN NLR BE A BIOMARKER FOR MUCOSITIS AND GVHD IN PATIENTS UNDERGOING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION?**

Isabella Christina Costa Quadras<sup>1</sup> - [isabellaquadras@gmail.com](mailto:isabellaquadras@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-0541-7254>

Fernanda Aparecida Stresser<sup>1</sup> - [fstresser7@gmail.com](mailto:fstresser7@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-7995-3466>

Stephanie Von Stein Cubas Warnavin<sup>2</sup> - [stephanie.warnavin@gmail.com](mailto:stephanie.warnavin@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0001-9829-6230>

Sandra Regina da Silva<sup>3</sup> - [sandra.silva8@hc.ufpr.br](mailto:sandra.silva8@hc.ufpr.br)

<https://orcid.org/0000-0002-3298-2825>

Vaneuza Araujo Moreira Funke<sup>3</sup> - [vfunke@gmail.com](mailto:vfunke@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-2122-7277>

Rafael Zancan Mobile<sup>3</sup> - [zancan.rafael@gmail.com](mailto:zancan.rafael@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-8603-2614>

Juliana Lucena Schussel<sup>2</sup> - [juliana.schussel24@gmail.com](mailto:juliana.schussel24@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0001-5204-0782>

<sup>1</sup> Undergraduate School of Dentistry, Department of Stomatology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Post Graduate Program in Dentistry, Department of Stomatology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>3</sup> Bone Marrow Transplantation Program, Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

**Corresponding author**

Juliana Lucena Schussel DDS, PhD

Department of Stomatology, Federal University of Paraná,

Av. Lothário Meissner 632 Jardim Botânico