



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

JULIANA SALOMÃO DAUD

**Mestrado
2017**

JULIANA SALOMÃO DAUD

**ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Gesmar Rodrigues Silva
Segundo

Uberlândia - MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D238a
2017

Daud, Juliana Salomão, 1984
Aspectos histopatológicos da esofagite eosinofílica em crianças e adolescentes / Juliana Salomão Daud. - 2017.
57 p. : il.

Orientador: Gesmar Rodrigues Silva Segundo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Esofagite eosinofílica - Teses. 3. Imunohistoquímica - Teses. 4. Histopatologia - Teses. I. Silva Segundo, Gesmar Rodrigues, 1973. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Salomão Daud

Aspectos histopatológicos da esofagite eosinofílica em crianças e adolescentes

Presidente da banca: Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Ciências da Saúde

Banca Examinadora

Prof. Dr. Arnaldo Moreira da Silva

(Examinador - UFU)

Profa. Dra. Karine Cristine de Almeida

(Examinadora – UNIPAM)

A Deus, minha família, em especial meus pais, e meu marido, João Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e todas as condições para executar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo, pela orientação, paciência e ensinamentos.

Aos meus pais, que não mediram esforços para me oferecer uma formação de qualidade, com valores éticos, morais e religiosos.

Ao meu marido, e agora à minha filha Maria Júlia, que estão sempre ao meu lado, me oferecendo amor, força e perseverança.

Aos meus irmãos e cunhados que estão sempre presentes, me apoiando em todos os momentos.

Aos meus eternos professores Dra. Aparecida Helena Baldo Guimarães, Dra. Tânia Machado de Alcântara e Dr. Arnaldo Moreira da Silva por toda dedicação, carinho e coleguismo.

À Prof. Dra. Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende pelo apoio durante a realização do projeto.

Aos profissionais do Serviço de Patologia, do Hospital de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia.

A todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial os pacientes e suas famílias envolvidas nesse estudo, meu sincero agradecimento.

RESUMO

Introdução: Esofagite eosinofílica (EoE) é uma desordem clínico-patológica, caracterizada por sintomas de disfunção esofágica e alterações histopatológicas com inflamação composta principalmente por eosinófilos, sendo necessário, pelo último consenso, 15 ou mais eosinófilos/campo microscópico de grande aumento (cmga). Contudo, esse achado histopatológico geralmente está acompanhado de outras alterações morfológicas na mucosa esofágica que fazem parte do quadro de resposta inflamatória e que têm sido cada vez mais investigadas. **Objetivos:** Descrever achados histopatológicos em biópsias de pacientes pediátricos e adolescentes com EoE e compará-las aos de pacientes com quadro clínico de epigastralgia. **Material e métodos:** Foram analisadas biópsias esofágicas, sendo dezessete com diagnóstico de EoE e dezessete com epigastralgia. Analisaram-se aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos, como número máximo de eosinófilos, alongamento das papilas, hiperplasia de células da camada basal, espaços intercelulares, microabscessos e expressão de CD1a. **Resultados:** Entre os achados histopatológicos, alongamento das papilas e hiperplasia da camada basal foram observados em todos os participantes com EoE e em nenhuma amostra do grupo epigastralgia. Aumento do espaço intercelular foi encontrado em todos os pacientes com EoE e em 29,41% dos pacientes com epigastralgia. **Conclusões:** A quantidade de eosinófilos pode não mostrar por si só a complexidade da EoE. Estudos futuros devem ser realizados tentando definir se algum achado morfológico pode ajudar no diagnóstico diferencial entre EoE e eosinofilia esofágica responsiva ao inibidor de bomba de prótons e se poderiam ser utilizados para acompanhamento da eficácia do tratamento da EoE.

Palavras-chave: Esofagite eosinofílica. Histopatologia. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Eosinophilic esophagitis (EoE) is a clinical-pathological disorder, characterized by symptoms related to esophageal dysfunction and histopathological alterations with inflammatory reactions primarily composed of eosinophils, being necessary, by the last consensus, 15 or more eosinófilos / high-power field (hpf). However, this histopathological finding is usually accompanied by other morphological changes in the esophageal mucosa that are part of an inflammatory response that has been increasingly investigated. **Objective:** To describe the histopathological findings from biopsies of pediatric and adolescent patients with EoE and to compare them with those from patients with clinical symptoms of epigastralgia. **Material and methods:** The results of esophageal cultures from biopsies were analyzed, seventeen with EoE diagnosis and seventeen with epigastralgia. The histopathological and immunohistochemical aspects, such as maximum number of eosinophils, papillary elongation, basal cell hyperplasia, dilatation of intercellular spaces, microabscesses, and CD1a expression were analyzed. **Results:** Among the histopathological findings, papillary elongation and basal cell layer hyperplasia were observed in all participants with EoE and in any of the sample of the epigastralgia group. Dilated intercellular space was found in all patients with EoE and in 29.41% of patients with epigastralgia. **Conclusions:** The amount of eosinophils may not by itself show the complexity of EoE. Future studies should be carried out in order to determine if any morphological findings may help in the differential diagnosis between EoE and proton-pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia, and whether they could be used to monitor the effectiveness of the EoE treatment.

Keywords: Eosinophilic esophagitis. Histopathology. Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 A e B – Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase na camada basal.....46
- Figura 2. A e B – Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase no alongamento de papilas.....46
- Figura 3. A e B – Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase na espongiosa47
- Figura 4. Fotomicrografia de microabscesso de eosinófilos no epitélio esofágico.....47
- Figura 5.
A e B – Comparação entre cortes histológicos de imuno-histoquímica do epitélio esofágico para células apresentadoras de抗ígenos.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cmga	Campo microscópico de grande aumento
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EDA	Endoscopia digestiva alta
EoE	Esofagite eosinofílica
FICF	Free and Informed Consent Form
HC	Hospital de Clínicas
hpf	High-power field
IBP	Inibidor de bomba de prótons
NPV	Negative predictive value
PPV	Positive predictive value
TA	Termo de Assentimento
TA	Term of assente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UGIE	Upper gastrointestinal endoscopy
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1 REVISÃO HISTÓRICA	11
2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	11
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS	13
2.4 ASPECTOS ENDOSCÓPICOS	13
2.5 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	14
2.6 TRATAMENTO	18
2.7 COMPLICAÇÕES E PROGNÓSTICO	19
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 ARTIGO	22
4.1 ABSTRACT	23
4.2 INTRODUCTION	24
4.3 MATERIALS AND METHODS	24
4.4 RESULTS	27
4.5 DISCUSSION	28
4.6 ACKNOWLEDGMENTS	30
4.7 REFERENCES	31
4.8 TABLES	34
4.9 FIGURE	38
4.10 CARTA AO EDITOR	40
REFERÊNCIAS	41
ILUSTRAÇÕES	46
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	49
APÊNDICE B – TERMO DE ASSENTIMENTO	50
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP	51

1 INTRODUÇÃO

Esofagite eosinofílica (EoE) representa uma doença crônica imuno-mediada, considerada emergente e caracterizada clinicamente por sintomas relacionados a disfunção esofágica e histologicamente por inflamação cujo exsudato no epitélio esofágico é composto principalmente por eosinófilos (LIACOURAS et al., 2011).

O diagnóstico da EoE é feito com base na presença de quadro clínico sugestivo de, achado morfológico de 15 ou mais eosinófilos na mucosa esofágica e na exclusão de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e ou de outras síndromes eosinofílicas (LIACOURAS et al., 2011; PAPADOPOLOU et al., 2014).

A apresentação clínica da EoE é variável, tendo como sintomas mais típicos disfagia intermitente com impactação alimentar, azia, dor retroesternal, regurgitações, dor abdominal, náuseas e vômitos (ATTWOOD et al., 1993; SAVARINO et al., 2015).

Os achados endoscópicos observados também são variáveis e todos eles podem ser encontrados em outras desordens esofágicas, não podendo ser considerados patognomônicos da EoE (LIACOURAS et al., 2011).

Os achados mais encontrados são anéis verticais, linhas concêntricas, mucosa espessa, de coloração esbranquiçada e opaca (CROESSE et al., 2003). Além disso, uma endoscopia digestiva alta (EDA) normal não exclui o diagnóstico de EoE, sendo necessária realização de exame histopatológico para auxílio diagnóstico (PAPADOPOLOU et al., 2014).

Já as alterações histopatológicas da EoE, tema de enfoque deste estudo, tem como principal característica o infiltrado inflamatório rico em eosinófilos. Quinze eosinófilos por campo microscópico de grande aumento (cmga) é considerado atualmente o valor limite mínimo para diagnosticar EoE. Entretanto, é recomendado o relato de todas as alterações morfológicas encontradas em espécimes de biópsia, como presença de microabscessos, hiperplasia de células da camada basal, aumento do alongamento de papilas e do espaçamento intercelular, entre outros (LIACOURAS et al., 2011).

A quantidade de eosinófilos pode não mostrar por si só a complexidade da patogênese da EoE. Por isso, a necessidade de abordarem-se outros aspectos

morfológicos e compará-los com grupos diversos associados a sintomas de disfagia e epigastralgia. Entre os principais aspectos morfológicos e os mais descritos na literatura estão a hiperplasia de células da camada basal e a espongiose, isto é aumento dos espaços intercelulares (COLLINS, 2014).

Na literatura médica, contudo, são poucos os trabalhos que avaliam a relação dos achados morfológicos, bem como sua intensidade, com outras desordens do trato digestivo superior.

Uma abordagem ampla dos aspectos morfológicos pode auxiliar na identificação de pacientes com necessidade de tratamento e promover melhora na qualidade de vida.

Além disso, trata-se de doença de caráter crônico com necessidade de tratamento medicamentoso e dietético por tempo prolongado e, em alguns casos, os achados morfológicos descritos nas biópsias não se correlacionam com a descrição endoscópica e ou com a sintomatologia clínica (PAPADOPOLOU et al., 2014), sugerindo haver outro(s) fator(es) a serem considerados, principalmente, no acompanhamento dos pacientes com EoE.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Revisão histórica

Esofagite eosinofílica (EoE) é uma entidade clínico-patológica relativamente emergente. O primeiro caso de permeação eosinofílica no esôfago foi descrito em 1978, em um adulto do sexo masculino, com quadro clínico de disfagia para alimentos sólidos (LANDRES, 1978). Após esse relato, outros casos foram descritos, retratando quadro clínico de disfagia, alteração do calibre esofágico e eosinofilia na mucosa do esôfago (PICUS; FRANK, 1981). Em 1989, Attwood e colaboradores estudaram um grupo de adultos com quadro clínico de disfagia semelhante à doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), porém sem obstrução esofágica e com monitoramento de pH normal e compararam com outro grupo de pacientes com diagnóstico de DRGE definido. Esses autores relataram que as diferenças entre esses dois grupos foi que no grupo sem alteração do pH, houve aumento significativamente maior de eosinófilos em relação ao grupo com DRGE (ATTWOOD et al., 1989). Em 1993, eles publicaram um artigo relatando os achados dos pacientes com disfagia, monitoramento normal do pH esofágico e densa permeação eosinofílica (>20 eosinófilos/campo de grande aumento) na mucosa e denominaram o conjunto desses achados de “eosinofilia esofágica com disfagia” (ATTWOOD et al., 1993).

Em 1994, Straumann e colaboradores descreveram uma série de dez pacientes com disfagia recorrente acompanhados por um período de quatro anos e que mostraram discretas alterações endoscópicas e altas concentrações de eosinófilos na mucosa. Nesse artigo, os autores atribuíram o nome de “esofagite eosinofílica idiopática” a esse conjunto de alterações encontradas (STRAUMANN et al., 1994).

Esses dois grupos de pesquisadores, tendo como responsáveis um cirurgião e um gastroenterologista, respectivamente, deram os primeiros passos para a definição da entidade atualmente denominada esofagite eosinofílica.

2.2 Aspectos epidemiológicos

Grandes progressos foram feitos na compreensão da epidemiologia da EoE nas últimas duas décadas. Os estudos iniciais publicados estiveram mais focados na descrição do caso e na caracterização da doença. Atualmente, as pesquisas estão

mais voltadas para a determinação de fatores de risco, etiologias novas e intrigantes hipóteses. Todos esses estudos fornecem informações para caracterização epidemiológica da EoE.

Apesar de se ter relatos de EoE ocorrendo em ampla faixa etária, desde crianças até idosos, a maior parte dos casos se concentra entre crianças, adolescentes e adultos, até a idade dos 50 anos (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2013).

Existe uma considerável discrepância entre os sexos, uma vez que o sexo masculino é de três a quatro vezes mais acometido pela EoE, no entanto, a razão disso ainda não está definida (DELLON et al., 2007; PRASAD et al., 2009; LIACOURAS et al., 2011).

Esofagite eosinofílica está presente na maioria dos grupos étnicos, embora alguns estudos relatam predominância em brancos não-hispânicos (PRASAD et al., 2009; DALBY et al., 2010). Apesar da EoE estar sendo alvo de pesquisas em todo mundo, é mais extensivamente estudada em países ocidentais, onde tem prevalência estimada de 0,4% entre crianças e adultos. Na população em geral, estima-se que um valor aceitável da prevalência da EoE seria de 0,5 – 1,0 caso/1000 pessoas/ano (DELLON; LIACOURAS, 2014). O maior estudo já realizado nos Estados Unidos encontrou prevalência de 57/100.000 casos (DELLON et al., 2013). Já em relação à incidência da EoE, a maioria dos relatos estima que esteja entre 6-13 casos/100.000 pessoas (DELLON; LIACOURAS, 2014).

No Brasil, entretanto, a EoE não possui valores de incidência e prevalência bem definidos para crianças e adolescentes, sendo que o que mais se encontra na literatura nacional são relatos ou série de casos publicados em diversos centros. Um estudo feito na cidade de Niterói-RJ mostrou prevalência em adultos com clínica de disfagia e queimação de 1,3% (BOECHAT et al., 2015).

Ressalta-se também a frequente relação da EoE com doenças alérgicas, ocorrendo muitas vezes de forma concomitante. A presença de atopias como alergia alimentar, asma, rinite alérgica e dermatite atópica ocorrendo simultaneamente com EoE é relatada em mais de 60% dos casos (SPERGEL et al., 2007). Muitos estudos relatam que 50 a 60% dos pacientes com EoE tem história prévia de atopia (PRASAD et al., 2009; CHEHADE et al., 2007). A maioria dos pacientes com EoE tem sensibilização com alérgenos alimentares, aeroalérgenos ou ambos baseado

em resposta positiva no teste cutâneo de punctura cutâneo ou teste sorológico de anticorpos IgE específico (LIACOURAS et al., 2011).

2.3 Aspectos clínicos

A EoE apresenta ampla diversidade em seu espectro clínico em adultos e crianças, com início dos sintomas em idades bastante diversas. Lactentes e crianças menores podem apresentar intolerância ou recusa alimentar, intensa disfagia, com descrição de sintomas persistentes da DRGE, mesmo após tratamento adequado com inibidores de bomba de prótons. Vômitos frequentes, irritabilidade e falência de ganho ponderal são também relatados (PEETIUK; MILLER; KAUL, 2007).

Considera-se que bebês e crianças menores apresentem geralmente dificuldades de amamentação, enquanto que vômitos e dor abdominal ou retroesternal sejam sintomas mais comuns em crianças na idade escolar (ACEVES et al., 2009).

Crianças maiores e adolescentes podem manifestar dor abdominal, vômitos, diarreia, disfagia e mesmo impactação com alimentos sólidos, ao passo que, em adultos, o achado clínico maior é a disfagia intermitente e a impactação, a qual pode surgir de forma abrupta em pacientes outrora assintomáticos (PUTNAM, 2009).

Alguns autores sugerem que em adultos, devido ao maior tempo de progressão da doença, sintomas como disfagia para alimentos sólidos e impactação são mais esperados, enquanto, nas crianças, sintomas inespecíficos, como dor abdominal e vômitos são os mais comuns (SINGLA et al., 2015).

São descritos também alterações no comportamento alimentar desses pacientes que passam a adotar perfil adaptativo na alimentação, evitando alimentos que possam causar disfagia e impactação. Essa alteração, consciente ou não, provocada pelo paciente necessita ser cuidadosamente investigada durante o exame clínico, a fim evitar retardo ou falha diagnóstica (SCHOEPFER et al., 2014).

2.4 Aspectos endoscópicos

Incontáveis estudos relataram presença de variadas anormalidades esofágicas em exames de endoscopia digestiva alta (EDA) em pacientes com EoE. Entre esses achados estão anéis esofágicos fixos, também conhecidos como “traqueilização”, anéis esofágicos transitórios, exsudato esbranquiçado, sulcos longitudinais, edema, estreitamentos esofágicos e lacerações da parede do esôfago

(LIACOURAS et al., 2011). Além disso, EDA mostrando mucosa normal também pode ser vista em casos de EoE (CROESSE et al., 2003).

Apesar de serem variados e numerosos os achados endoscópicos na EoE, nenhum deles é considerado patognomônico, um vez que todos podem ser encontrados em outras desordens esofágicas. (LIACOURAS et al., 2011) A presença de exsudato brancacento, por exemplo, pode induzir confusão diagnóstica na endoscopia com esofagite fúngica. Os achados histopatológicos, porém, mostram diferenças que permitem a distinção entre essas entidades (AHMED et al., 2000).

Enquanto os aspectos histopatológicos da EoE são semelhantes em todas as faixas etárias, os achados endoscópicos podem variar. Essa variação geralmente é devida ao tempo de progressão da doença, podendo, em casos mais prolongados, ser encontrado alteração decorrente de remodelação esofágica, como constrições fibrosas (SCHOEPFER et al., 2013). Na endoscopia, crianças geralmente apresentam achados com características inflamatórias, incluindo placas brancacentas e sulcos longitudinais, ao contrário de adultos e daqueles com doença de longa progressão que mostram principalmente aspectos indicativos de fibrose e estenose, como anéis e constrições SCHOEPFER et al., 2013; SINGLA et al., 2015; DELLON; LIACOURAS, 2014).

Segundo as diretrizes para EoE do Colégio Americano de Gastroenterologia, de 2013, a recomendação é para que sejam coletados de 2 a 4 fragmentos da mucosa esofágica durante o procedimento endoscópico, tanto da parte proximal quanto da parte distal, de pacientes com suspeita para EoE (DELLON et al., 2013). Além disso, coleta de fragmentos do antro gástrico e do duodeno é recomendada em todas as crianças e em adultos com alguma anormalidade, a fim de se excluir outras causas de eosinofilia esofágica, como gastroenterite eosinofílica, doença de Crohn e doença celíaca (MOAWAD et al., 2016).

2.5 Aspectos histopatológicos

Características histopatológicas da EoE são essenciais, visto que uma delas é o fator necessário para se fazer o diagnóstico, atualmente definido como a presença de 15 ou mais eosinófilos/cm² permeando o epitélio da mucosa esofágica (LIACOURAS et al., 2011).

Historicamente, a presença de eosinófilos intraepiteliais era considerada indicador de DRGE. Após estudos associando aspectos clínicos e

anatomopatológicos, chegou-se à definição da entidade EoE (FURUTA et al., 2007). A variabilidade de critérios diagnósticos no tocante à eosinofilia esofágica foi avaliada em uma meta-análise com 318 publicações, 8 revelando distintas avaliações e interpretações histológicas, com variação de 5 a 30 eosinófilos utilizados como parâmetros para diagnóstico de EoE (DELLON et al., 2007). No último consenso, os estudos mostraram que o achado de 15 ou mais eosinófilos/cm² seria o valor limite mais adequado a ser considerado (LIACOURAS et al., 2011).

Para uma avaliação satisfatória dos achados morfológicos, recomenda-se que se tenha de dois a quatro fragmentos de mucosa esofágica da parte proximal e distal, e que esses fragmentos estejam bem orientados na lâmina histológica (DELLON et al., 2013).

A contagem de eosinófilos em fragmentos esofágicos é essencial para diagnóstico. Porém, é importante e recomendado que se avaliem também outras características morfológicas que fazem parte de um quadro inflamatório inespecífico. Entre elas, destacam-se hiperplasia de células da camada basal, alongamento de papilas do córion, espongiose, microabscessos de eosinófilos e a tendência à superficialização dos eosinófilos na mucosa. Esses achados podem ser encontrados na EoE, como também em outras desordens esofágicas cuja patogênese inclui processo inflamatório, como esofagite de refluxo, esofagite fúngica, envolvimento esofágico na doença de Crohn, entre outras (LIACOURAS et al., 2011).

Ressalta-se que esses achados, bem como a contagem de eosinófilos, são importantes não só para o diagnóstico da EoE, mas também no acompanhamento dos pacientes, a fim de averiguar correlação sintomático-endoscópico-morfológica (LIACOURAS et al., 2011).

Em relação aos achados morfológicos adicionais à contagem de eosinófilos, tem-se a hiperplasia de células da camada basal. A camada basal é uma das partes que compõe o epitélio de revestimento do esôfago, juntamente com as camadas espinhosa e superficial. Em situações de normalidade (Figura 1A), ela ocupa cerca de 5 a 15% da espessura do epitélio esofágico (DENARDI; RIDDELL, 2012). Quando se tem aumento da sua espessura, tem-se hiperplasia. Essa hiperplasia pode ser graduada em leve, quando o aumento é inferior a 30% e acentuada quando é igual ou superior a 30% (Figura 1B). Para verificar se a presença da hiperplasia de células da camada basal, identifica-se o seu nível superior, localizando onde os

núcleos das células epiteliais estão separados entre si por uma distância maior que o seu diâmetro. Desse ponto para baixo, em direção ao córion, tem-se a camada basal (FIOCCA et al., 2011).

Hiperplasia de células da camada basal pode estar presente em vários processos inflamatórios do esôfago. Porém, estudos realizados em crianças, analisando esse achado na EoE e em outras entidades, principalmente DRGE, encontraram que a proliferação de células da camada basal foi mais intensa em pacientes com EoE em relação àqueles com DRGE, podendo ser um achado que se relacione mais com EoE (STEINER et al., 2006). Estudo recente analisou, entre outros aspectos, a presença de hiperplasia de células da camada basal na EoE, na DRGE e na eosinofilia esofágica responsiva a inibidor de bomba de prótons e constatou que esse fenômeno foi mais frequentemente encontrado em pacientes com EoE e com eosinofilia esofágica responsiva a inibidor de bomba de prótons do que naqueles com DRGE (JIAO et al., 2017).

Hiperplasia de células da camada basal é considerada uma das características de remodelamento esofágico na EoE, uma vez que é o achado morfológico indicativo de proliferação ativa de células da zona basal da mucosa, uma fonte constante de renovação do epitélio, contribuindo também para extensão das projeções da lâmina própria (ACEVES, 2014).

Alongamento de papilas é outro aspecto morfológico da lesão esofágica encontrado na EoE. (LIACOURAS et al., 2011; FURUTA et al., 2007). Papilas são extensões digitiformes da lâmina própria, que é o tecido conjuntivo vascularizado subepitelial, em direção à camada epitelial (DENARDI; RIDDELL, 2012) (Figura 2A). Refere-se que estão alongadas quando acima de 50% a 66% da espessura do epitélio total. Considera-se alongamento leve quando esse aumento é inferior a 75% e acentuado quando está igual ou acima de 75% da espessura do epitélio (Figura 2B). Tal alongamento é identificado a partir de estruturas vasculares presentes na projeção de lâmina própria em direção ao epitélio (FIOCCA et al., 2011).

São escassos os trabalhos que abordam essa alteração na EoE. Vindigni e colaboradores encontraram alongamento das papilas em todos os 22 casos analisados de EoE (VINDIGNI et al., 2010). Outros estudos que analisaram esse achado em fragmentos esofágicos de pacientes com e sem EoE concluíram que o alongamento de papilas na mucosa é maior em pacientes com EoE, principalmente

em pacientes que mostraram acentuada hiperplasia de células basais (ATTWOOD et al., 1993; COLLINS, 2014).

Espongiosa, também conhecida como dilatação ou aumento dos espaços intercelulares, é uma característica morfológica que pode estar presente em processos inflamatórios que acometem epitélios de várias regiões anatômicas. É definida como dilatações irregulares dos espaços entre as células, vistas como “bolhas” ou “pontes”, podendo ser graduadas em pequenas ou grandes (Figuras 3A,B). São consideradas pequenas quando esse espaço é menor que o diâmetro de um linfócito pequeno e grande quando maior (FIOCCA et al., 2011).

No esôfago, esse achado pode estar relacionado tanto a DRGE quanto a EoE. Estudos experimentais demonstraram que espongiosa provoca aumento na permeabilidade paracelular sugerindo ser um fator facilitador da penetração de ácido, no caso da DRGE ou de antígenos, no caso da EoE (ORLANDO et al., 1981; TOBEY et al., 1996).

Estudos realizados mostraram ser um achado mais relacionado à intensidade de lesão da mucosa, do que com a natureza do processo inflamatório em si, sendo mais útil em mostrar como o epitélio se comporta frente a uma agressão do que em indicar em qual entidade está mais frequente (RAVELLI et al., 2006; RAVELLI et al., 2014).

A distribuição de eosinófilos intraepiteliais em pacientes com EoE é também um achado característico. Eles tendem a se alinhar no terço superior do epitélio, paralelamente à superfície epitelial (TEITELBAUM et al., 2002; ATTWOOD et al., 1993). Essa tendência à “superficialização” é um achado morfológico mais associado à EoE do que DRGE (VINDIGNI et al., 2010; LIACOURAS et al., 2011; GRIN; STREUTKER, 2015). Com esse processo, os eosinófilos adquirem maior tendência de formar microabscessos (Figura 4), que são definidos como acúmulos de quatro ou mais eosinófilos no epitélio (COLLINS, 2014). São achados muito sugestivos de EoE, sendo encontrados, por alguns autores somente em pacientes com contagem de eosinófilos intraepiteliais superior a 15/cmga (DEBROSSE et al., 2010).

Também foi abordado o comportamento das células apresentadoras de antígenos na EoE. Essas células estão localizadas em região suprabasal, são escassas na mucosa esofágica e são morfologicamente identificadas por meio de reação imuno-histoquímica usando marcadores como CD1a (Figura 5A), S-100 e

Cd6 (DENARDI; RIDDELL, 2012). Identifica-se o aumento delas quando se encontram acima da camada suprabasal (Figura 5B). Atuam de forma a apresentar抗ígenos a linfócitos, proporcionando uma ligação entre resposta imune inata e adaptativa. Esse processo pode ser o evento que inicia a cascata de citocinas que leva à EoE (MULDER; JUSTINICH, 2011).

Até o momento são escassos os estudos que analisam a relação das células apresentadoras de抗ígenos na EoE. Teitelbaum e colaboradores encontraram aumento significativo de células apresentadoras de抗ígenos por meio de análise imuno-histoquímica utilizando como marcador o CD1a. Observaram que no grupo de pacientes com EoE, quando comparado ao grupo com mucosa normal, havia aumento da expressão de CD1a (TEITELBAUM et al., 2002). Já Mulder e Justinich encontraram aumento de células CD1a+ somente na parte proximal do esôfago de crianças com EoE, normalizando sua expressão após tratamento (MULDER; JUSTINICH, 2011).

Alguns estudos, porém, não encontraram aumento da expressão de células CD1a+ em casos de EoE, mas encontraram número aumentado em pacientes com esôfago de Barrett e adenocarcinoma (PHILPOTT et al., 2015). Contudo, tem-se sugerido que outras células que não são as células apresentadoras de抗ígenos profissionais, como células epiteliais, possam adquirir esse papel. Esse processo pode atuar na predisposição e perpetuação da exposição de抗ígenos (LUCENDO et al., 2007).

O conjunto de alterações morfológicas que podem estar presentes na EoE deve ser relatado nos laudos anátomopatológicos. Essas descrições podem, futuramente, auxiliar na identificação de biomarcador de inflamação confiável, visando limitar o número de EDA necessárias para confirmar o diagnóstico de EoE e controle de tratamento (LIACOURAS et al., 2011). Almejar a redução desses procedimentos invasivos é essencial, principalmente, no manejo de crianças que necessitam de sedação para que sejam realizados.

2.6 Tratamento

Tratamento dietético deve ser considerado em todas as crianças com EoE, sendo indicado acompanhamento com profissional da área a fim de garantir qualidade e quantidade de calorias e nutrientes adequados para bom desenvolvimento e crescimento do paciente pediátrico. Recomenda-se que

alimentos constatados como desencadeadores de EoE sejam restringidos da dieta por período indefinido, enquanto aqueles que não foram comprovados como tal, sejam reintroduzidos com observação cautelosa (LIACOURAS et al., 2011; SPERGEL et al., 2007).

Inibidor de bomba de prótons (IBP) é um medicamento útil para excluir DRGE como causa de eosinofilia esofágica, sendo que a dose recomendada em crianças é de 1 mg/kg, duas vezes ao dia, durante 8 a 12 semanas. Contudo, IBP também são usados no tratamento da EoE em pacientes que apresentem DRGE como comorbidade. Sabe-se que IBP primariamente atua bloqueando secreção ácida, porém questiona-se se também tem efeito na eosinofilia esofágica por outros mecanismos, uma vez que se mostraram úteis no tratamento de pacientes com eosinofilia esofágica responsiva a IBP (LIACOURAS et al., 2011).

Tratamento com corticosteroide tópico, por sua vez, deve ser considerado em todas as crianças e adultos com diagnóstico de EoE, tanto como terapia inicial como de manutenção. Contudo, preconiza-se que se individualize a situação de cada paciente, considerando características da intensidade da doença, estilo de vida, padrão socioeconômico, entre outros. O uso crônico de esteroides tópicos deve levar os profissionais da saúde a se atentarem para possíveis efeitos adversos e monitorar cuidadosamente a curva de crescimento da criança (LIACOURAS et al., 2011; CALDWELL et al., 2010).

2.7 Complicações e prognóstico

Pacientes com EoE podem apresentar, como complicações, impactação alimentar, constricções esofágicas, redução do calibre do esôfago e perfuração da parede.

Impactação alimentar é definida como evento que ocorre após ingestão de alimento, quando a matéria deglutida fica retida no esôfago, frequentemente necessitando de intervenção endoscópica para sua resolução (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2009; PRASAD et al., 2009).

Constricções esofágicas tem sua definição relacionada com anéis esofágicos que são manifestação comum da doença em adultos. São diferenciados da redução do calibre do esôfago, uma vez que a área de envolvimento deste é maior em relação ao anel.

Em relação à perfuração da parede esofágica, ela pode ocorrer de forma completa, com saída do conteúdo esofágico e gástrico para a cavidade torácica, necessitando de tratamento cirúrgico ou pode ser de forma incompleta. Uma ruptura parcial da parede ocorre quando se encontra quantidade limitada de ar ou contraste extravasado para o mediastino, sendo preferível, nesses casos uma abordagem conservadora. As perfurações esofágicas podem ocorrer relacionadas ou não ao procedimento endoscópico para dilatação luminal (LIACOURAS et al., 2011).

O prognóstico a longo prazo, de pacientes com EoE, é desconhecido. Alguns pacientes podem apresentar uma evolução caracterizada por períodos sintomáticos seguidos por períodos de remissão. Outros pacientes podem apresentar quadro clínico de aparente remissão espontânea, sendo desconhecido, nesses, o risco de recorrência. É possível que pacientes com doença de longa evolução, sem tratamento, evoluam para remodelamento esofágico, constricções e anéis. Ainda não está claro, no entanto, se o tratamento dietético ou medicamentoso altera a história natural da doença (LIACOURAS et al., 2011; CARR; WATSON, 2011).

2.8 Considerações finais

Apesar de se ter uma literatura rica sobre EoE, estudos que abordam aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos em pacientes pediátricos com EoE, em acompanhamento clínico-endoscópico, são atualmente escassos.

Aprofundar na descrição dos achados histopatológicos da EoE e/ou compará-los com outras causas de epigastralgia pode contribuir para melhorar o entendimento sobre a atividade inflamatória dessa entidade e auxiliar em uma melhor correlação com achados clínicos e endoscópicos. Almeja-se, a partir dos estudos, limitar procedimentos invasivos, principalmente em crianças e adolescentes que necessitam de sedação, melhorar qualidade de vida e reduzir os gastos públicos destinados a esses procedimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar os achados histopatológicos encontrados em espécimes de biópsias endoscópicas esofágicas de crianças e adolescentes com diagnóstico de EoE e compará-los com achados morfológicos de pacientes com outros diagnósticos que apresentam quadro clínico de epigastralgia.

3.2 Objetivos Específicos

- a) analisar os achados histopatológicos encontrados em espécimes de biópsias esofágicas de pacientes pediátricos submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta (EDA);
- b) analisar a expressão imuno-histoquímica de CD1a no epitélio esofágico dos pacientes;
- c) correlacionar os achados histopatológicos e imuno-histoquímico encontrados nos pacientes com EoE e pacientes com clínica de epigastralgia;
- d) analisar a relação dos achados histopatológicos e imuno-histoquímico com número de eosinófilos nos pacientes com EoE.

4 ARTIGO

“Histopathological parameters on esophageal specimens from childhood are useful to differentiate eosinophilic esophagitis and other diseases requiring upper digestive endoscopies”

Juliana Daud,¹ Tania Alcantara,¹ Ignez Candelori,² Erica Rezende,³ Gesmar Segundo⁴

¹Department of Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Uberlândia,

²Laboratory of Immunohistochemistry, Department of Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Uberlândia,³Pediatric Gastroenterology Service, Clinical Hospital, Federal University of Uberlândia, ⁴Allergy and Pediatric Immunology, Clinical Hospital, Federal University of Uberlândia

Corresponding author: G. Segundo – Hospital de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará, 1720 – 38405-320 – Uberlândia, MG – Brasil - + 55 34 3218.2263 e-mail: gesmar@bol.com.br

Conflicts of interest

The authors certify that they are not involved in any organization or entity with financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

4.1 Abstract

Aims: Eosinophils number on esophageal biopsies specimens is crucial for eosinophilic esophagitis diagnosis (EoE), however, the value of other histology features remain unclear. The study aims to describe these histopathological findings from pediatric and adolescent patients

with EoE and to compare them with those from patients with other diseases leading to upper gastrointestinal endoscopy (UGIE) in order to analyze their utility on the EoE diagnosis. **Methods and results:** Seventeen patients with EoE diagnosis and 17 with no EoE who underwent UGIE were enrolled. The histopathological and immunohistochemical aspects were analyzed and all parameters showed significant difference between both groups. Papillary elongation and basal cell layer hyperplasia were found in all participants of EoE group and in none of other group. Microabscesses and CD1a expression were found only in the EoE group, but not in all patients. Dilated intercellular space was found in all patients but also in almost 30% of other group. **Conclusions:** The amount of eosinophils may not explain itself the complexity of EoE. The histopathological and immunochemical aspects showed to be useful resource in addition to eosinophils number for EoE diagnosis. Future studies should be carried out in order to evaluate these parameters utility to monitor the effectiveness of the EoE treatment.

Keywords: Eosinophilic esophagitis, histopathology, immunohistochemistry

4.2 Introduction

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a clinical-pathological disorder currently defined as a chronic immune/antigen-mediated disease, characterized by symptoms related to esophageal dysfunction and histopathological alterations with inflammatory reactions primarily composed of eosinophils. The main symptoms associated with EoE are food impaction, retrosternal pain, regurgitation, abdominal pain, nausea and vomiting, which vary according to the age of the patient^{1,2,3}. The diagnosis of EoE is performed by clinical suspicion, endoscopic findings and, as a diagnostic criterion, at least 15 eosinophils per high-power field (eosinophils/hpf) must be present in esophageal epithelium^{1,2,4}. However, this histopathological finding is usually accompanied by other morphological changes in the esophageal mucosa that are part of an inflammatory response. Among these other findings, we can mention cell hyperplasia of the basal layer, papillary elongation, dilation of the intercellular space and presence of microabscesses⁵.

The long-term chronic inflammatory process, rich in eosinophils, may cause remodeling of the submucosal layers of the esophagus, resulting in fibrous constriction^{6,7} and complications such as esophageal perforation and malnutrition⁷. Therefore, the intensity of the eosinophilic infiltrate, the inflammatory process, and the morphological changes have been increasingly investigated, mainly from the analysis of esophageal mucosal biopsy samples obtained at endoscopy^{7,8,9}.

The study aims to describe these histopathological findings from pediatric and adolescent patients with EoE and to compare them with those from patients with other diseases leading to upper gastrointestinal endoscopy (UGIE) in order to analyze their utility on the EoE diagnosis.

4.3 Materials and Methods

Seventeen children and adolescents (up to 18 years of age) with diagnosis of EoE according to the 2011 consensus, and under follow-up at the Food Allergic and Pediatric Gastroenterology Outpatient Clinics at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG), and seventeen children and

adolescents (up to 18 years of age) with other gastrointestinal symptoms who underwent upper gastrointestinal endoscopy (UGIE), called MiX, matched by gender and age, were invited to participate in the study after approval by the Ethics Committee and having the Free and Informed Consent Form (FICF) signed by the parents or guardians and the Term of Assent (TA) by those older than 13 and younger than 18 years of age. During the UGIE exam, which was performed to monitor patients with EoE and/or to diagnostic investigation for other gastrointestinal diseases, four fragments were collected for histological analysis (two in the middle third and two in the upper third of the esophagus) from the 34 patients referred.

Histological analysis

The fragments obtained from the endoscopic biopsy were processed for histopathological analysis. In this procedure, all samples were fixed in 10% buffered formalin and the material identified by a numerical record that will accompany it during all procedures of the histological technique. All fragments, after being fixed in formaldehyde solution, were processed routinely by manual technique. After preparing the paraffin block, the fragments were sectioned into the microtome in slices 4-6 µm thickness, placed on histological slides and stained with hematoxylin (H) and eosin (E). The histological slides of each case were analyzed in light microscope (Olympus BX 41) by two pathologists independently, one of them the author. The analysis was made to determine the following histopathological aspects, based on morphological parameters described by Fiocca *et al.*⁵: (1) presence and maximum number of eosinophils and their predominant location (upper half of the epithelium thickness or lower half of the epithelium thickness); (2) presence and intensity of papillary elongation (mild - an increase lower than 75% in epithelial thickness, and severe – an increase greater than 75% in epithelial thickness); (3) presence and intensity of basal cell hyperplasia (mild - an increase lower than 30% in epithelial thickness, and severe – an increase greater than 30% in epithelial thickness); (4) presence and intensity of dilated intercellular spaces, also known as spongiosis (small – an increase smaller than the diameter of a small lymphocyte, and large – an increase greater than the diameter of a small lymphocyte); and (5) presence of eosinophilic microabscesses (defined as accumulation of 4 or more eosinophils in the mucosa)¹⁰.

Immunohistochemical analysis

Paraffin-embedded sections of biopsy specimens of approximately 3 µm thickness were placed on histological slides previously treated with silane (SIGMA, Chemical Co., USA), deparaffinized in xylol (2 baths of 20 minutes each), rehydrated in descending concentrations of ethanol and washed in running water (10 minutes), and then subjected to antigen heat retrieval using EDTA buffer (0.3722 g of EDTA for 1000 ml buffer, pH 8.03) and microwave oven heating (3 cycles of 5 minutes). Then the endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxide 10 volumes (4 baths of 3 minutes). Incubation was carried out for 15 hours at 50° C with the anti-human CD1a monoclonal antibody (Clone O10, DAKO, California, North America); followed by 30 minutes incubation in Polymer Detection with peroxidase (HiDef HRP-CAT 954D-32, Cell Marque). The staining was performed by incubation with the chromogenic substrate 3,3'-diaminobenzidine developer solution for 5 minutes, followed by counterstaining with Harris hematoxylin (1-2 minutes). The slides were dehydrated in ascending ethanol solutions, diaphonized in xylol and mounted with coverslips and Damar gum. Controls known to express the tested antigen were used. The immunohistochemical reactions were analyzed to verify if there was, in each material, an increase of antigen-presenting cell, by Cd1a expression above the basal and parabasal layers.

Medical records analysis

For analysis of EoE diagnostic criteria (endoscopic findings and number of eosinophils observed in the biopsy at diagnosis), the medical records with all information related to the findings after endoscopy, clinical diagnosis, and the presence of atopic diseases were analyzed.

Statistical analysis

The paired *t*-test was used for analysis of the continuous variables and the Fisher's exact test for categorical variables in the comparison between groups. The unpaired *t*-test was used in the comparisons within the same group. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of each finding was calculated using the final diagnosis following the criteria used by the

last EoE consensus ⁴. The two-tailed test at $p < 0.05$ significance level used GraphPad Prism 5.0 programs (La Jolla, CA).

4.4 Results

Clinical Findings

In each group, EoE and MiX, there were 10 (58.8%) male patients and seven (41.2%) female patients. The average age in the respective groups is about 11 and 10 years. About 82% (14/17) of patients with EoE have a history of atopy, and 57.14% (8/14) of these patients have food allergy (Table 1).

Among the 17 patients in the MiX group, we observed that 9 patients presented gastritis diagnosis, of which 3 were associated with *H. pylori*; 5 presented diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD); 1 of bulbitis; and 2 patients had no final diagnosis described in medical records.

Histological and immunohistochemical findings.

The mean eosinophil count found in the group of patients with EoE was 157.88 eosinophils/hpf, most of them located in the upper half of the epithelium (14/17), and also, all presented mucosal permeability to eosinophils. Moreover, the mean eosinophil count found in the MiX group was 1.29 eosinophils/hpf. Approximately 70% (12/17) presented a null count of eosinophils, and from the 5 patients who presented eosinophilic infiltration most eosinophils were located in the lower half of the mucosa.

The presence of elongation of lamina propria papillae in the EoE group was observed in all participants, and 70.58% (12/17) showed severe papillary elongation, while in the MiX group no sample evidenced this finding. Likewise, the basal cell hyperplasia was observed in all samples of EoE patient, and 70.58% (12/17) was observed in the severe form, and this finding was also not verified in the group MiX. The finding of microabscesses occurred in 52.94% (9/17) patients with EoE and, again, in any of the patients of MiX group. Spongiosis was found in all patients in the EoE group, and 76.47% (13/17) of the patients presented significant dilated

intercellular space. Moreover, among patients of MiX group, 29.41% (5/17) presented the alteration; however, the majority presented the mild form (80%).

The increase in Cd1a expression above the basal and parabasal layers was found in 58.82% (10/17) of patients with EoE, and was not observed in any sample of MiX group patients. All the morphological and immunohistochemical findings above described presented a difference statistically significant in the comparison between the two groups and are shown in Table 2. Figure 1 show normal and altered morphological/immunohistochemical features found on biopsies specimens from patients enrolled in this study.

In this cohort of patients, we calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for each morphological and immunohistochemical finding evaluated by the study (Table 3).

Considering only the EoE group, the morphological alterations analysis were statistically significant in the mean number of eosinophils and the intensity of the basal layer hyperplasia, and a difference in relation to the presence or absence of microabscesses was also verified. However, the other morphological and immunohistochemical findings did not demonstrate this difference (Table 4).

4.5 Discussion

Eosinophils are key players in the remodeling process ¹¹, for this reason, their quantitative analysis in the follow-up of patients with EoE is essential. In this study, the eosinophil counts among patients with EoE were increased, evidencing that even patients with EoE diagnosis who were already submitted to treatment and are in follow-up present an active pathogenic process, increasing risk of progression to fibrosis and other esophageal complications ^{6,7}.

The amount of eosinophils may not show by itself the complexity of the EoE pathogenesis. Therefore, it is required to address other morphological aspects and compare them with different groups. Among the other histopathological aspects found in the esophageal epithelium, the main and most described in the literature are basal cell hyperplasia and dilated intercellular space (spongiosis) ¹⁰.

Basal cell hyperplasia is considered one of the features of esophageal remodeling in the EoE, since it is the morphological finding indicative of active proliferation of cells of the basal epithelium zone, a constant source of epithelium renewal, also contributing to the extension of the projections of the lamina propria¹². Although observed in several inflammatory processes of the esophagus, Steiner *et al.* found that the proliferation of cells of the mucosal basal layer was more severe in children with EoE than those with GERD, which may be a finding that is more related to EoE¹³. In our study we observed similar data, since all patients in the EoE group showed basal layer hyperplasia, and most of which was severe, while the patients in the other group showed no alteration, and also, there was a significant difference analyzing the intensity and mean number of eosinophils observed in the biopsy.

Papillary elongation is another morphological finding of esophageal lesion observed in EoE^{4,7}. Despite the limited studies addressing this alteration in EoE, Vindigni *et al.* found papillary elongation in all 22 EoE cases analyzed¹⁴, as well as in the study in question. Other studies that analyze this finding in EoE biopsies conclude that elongation of mucosal papillae is greater in EoE patients than in normal mucosal biopsies, especially in patients with severe basal cell hyperplasia^{3,10}. In our study, no case of the group without EoE diagnosis presented the alteration.

Recent studies have shown that increased permeability of the esophageal epithelium is one of the main aspects of EoE, since it allows the infiltration of the antigen and its recognition by the mucosa. This increase in permeability may be related to the dilated intercellular space^{15,16}. Spongiosis is described in the literature as a morphological feature present in several esophageal alterations in children, such as in GERD and in EoE itself, and its intensity reflects the degree of lesion in the esophageal mucosa^{17,18}. The present study supports these findings and also observes the presence of spongiosis in patients of the MiX group showing their lower specificity in relation to EoE.

The microabscesses are findings highly suggestive of EoE. DeBrosse *et al.* found microabscesses only in patients with an eosinophil count greater than 15/hpf¹⁹. In our study we observed the significant difference in the mean number of eosinophils found and the presence of these microabscesses. Some studies also

relate the increased tendency of eosinophils to be located in the upper half of the epithelium with greater possibility of microabscesses formation ^{19,20}.

The approach of preferential localization of eosinophils in the mucosa, i.e., occupying more the upper or the lower half, is an important morphological feature described in the last consensus ⁴ and addressed in the present study. The increased tendency of eosinophils to be located on the surface of the mucosa is a morphological finding more associated with EoE than GERD ^{4,14,21}. The data found in this study strengthen the close association of EoE with the tendency of eosinophils to be located in superficial layers.

Regarding the immunohistochemical expression of Cd1a, there are also few articles addressing their expression in EoE. These cells act as antigen-presenting cells and under allergic conditions participate in host sensitization. Teitelbaum *et al.* found a significant increase of Cd1a in the EoE group compared with the normal mucosa group ²². Mulder and Justinich found an increase in Cd1a+ cells only in the proximal part of the esophagus of children with EoE, normalizing their expression after treatment ²³. In our study we found a significant increase in their expression in patients with EoE in comparison with the MiX group and also in patients with high intraepithelial eosinophils counts.

The sensitivity and specificity of the morphological and immunohistochemical findings observed in the present cohort of patients with EoE, in comparison with other diseases that led to endoscopy, show their importance for the diagnosis and likely for the follow-up of these patients, as suggested by a recently published study showing the reduction of these changes during the patients treatment and recommending the creation of a score of points to contribute to the diagnosis and follow-up of patients with EoE ²⁴.

Few studies in the literature analyze clinical and morphological biopsies specimens' features of the EoE in children and adolescents comparing with abdominal pain and vomit conditions. The present study aims to contribute to the characterization of the histopathological aspects of patients with EoE diagnosis and to strengthen the morphological and immunohistochemical findings as factors that help in the diagnosis and follow-up of these patients and shows the value of these

parameters in the diagnosis of EoE, showing the high sensitivity and specificity of these findings. Future studies should be carried out in order to determine if any of the morphological or immunohistochemical findings may help differentiate EoE and proton pump inhibitor esophageal eosinophilia, even though some authors considered them only different spectrum of a same disease, and whether they may be used as a follow-up to the effectiveness of the EoE treatment.

4.6 Acknowledgments

This study was supported by the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal de Uberlândia, particularly from the sectors of Archive, Gastroenterology and Pathology, respectively represented by Elvira Soares da Fonseca Borges, Cristina Palmer and Aparecida Helena Baldo Guimarães.

4. 7 References

1. Savarino E, Tolone S, Caccaro R, Bartolo O et al. Clinical, endoscopy, histological and radiological characteristics of Italian patients with eosinophilic oesophagitis. *Dig Liver Dis* 2015; 47(12):1033-1038.
2. Roman S, Savarino E, Savarino V, Mion F. Eosinophilic oesophagitis: from physiopathology to treatment. *Dig Liver Dis* 2013; 45:871-8.
3. Atwood S E, Smyrc T C, Demeester T R, Jones J B. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38:109-16.
4. Liacouras C A, Furuta G T, Hirano I et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(1):3-20.
5. Fiocca R, Mastracci L, Milione M, Parente, P, Savarino V. Microscopic esophagitis and Barretts's esophagus: The histology report. . *Dig Liver Dis* 2011; 43(S):319-330.
6. Schoepfer A M, Safroneeva E, Bussmann C et al. Delay in Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis Increases Risk for Stricture Formation in a Time-Dependent Manner. *Gastroenterology* 2013; 145:1230-36.
7. Furuta G T, Katza D A. Eosinophilic Esophagitis. *N Engl J Med* 2015; 373:1640-8.

8. Adachi K, Mishiro T, Tanaka S, Kinoshita Y. Suitable biopsy site for detection of esophageal eosinophilia in eosinophilic esophagitis suspected cases. *Dig Endosc* 2016; 28:139-144.
9. Schoepfer A M, Panczak R, Zwahlen M et al. How do gastroenterologists assess overall activity of eosinophilic esophagitis in adult patients? *Am J Gastroenterol* 2015;110(3):402-14.
10. Collins M H. Histopathology of Eosinophilic Esophagitis. *Dig Dis* 2014; 32:68-73.
11. Philpott H, Nandurkar S, Thien F, Gibson P R, Royce S G. Eosinophilic esophagitis: A clinicopathological review. *Pharmacol Ther* 2015; 146:12-22.
12. Aceves S S. Remodeling and Fibrosis in Chronic Eosinophil Inflammation. *Dig Dis* 2014; 32:15-21.
13. Steiner S J, Kernek K M, Fitzgerald J F. Severity of basal cell hyperplasia differs in reflux versus eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 45:506-509.
14. Vindigni C, Villanacci V, Marini M et al. Eosinophilic esophagitis: na Italian experience. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102:15-19.
15. Katzka D A, Ravi K, Geno D M, Smyrk T C, Iyer P G. Endoscopic mucosal impedance measurements correlate with eosinophilia and dilation of intercellular spaces in patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; 13(7):1242-1248.
16. Van Rhijn B D, Weijenborg P W, Verheij J et al. Proton Pump Inhibitors Partially Restore Mucosal Integrity in Patients with Proton Pump Inhibitor-Responsive Esophageal Eosinophilia but Not Eosinophilic Esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12:1815-1823.
17. Ravelli A M, Villanacci V, Ruzzenenti N et al. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 45(5):510-5.
18. Ravelli A, Villanacci V, Cadei M, Fuoti M, Gennati G, Salemme M. Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 59:589-593.
19. DeBrosse C W, Collins M H, Buckmeier Butz B K et al. Identification, epidemiology, and chronicity of pediatric esophageal eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:112-9.

20. Grin A, Streutker C J. Esophagitis. Old Histologic Concepts and New Thoughts. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139:723-729.
21. Benett AE, Goldblum JR, Odze R. Inflammatory disorders of the esophagus. In Odze R, Goldblum JR. *Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract and pancreas*. Philadelphia, PA: Saunders, 2014; 242-245
22. Teitelbaum J E, Fox V L, Twarog F J et al. Eosinophilic esophagitis in Children: Immunopathological Analysis and Response to Fluticasone Propionate. *Gastroenterology* 2002; 122:1216-1225.
23. Mulder D J, Justinich C J Understanding eosinophilic esophagitis: the cellular and molecular mechanisms of an emerging disease. *Mucosal Immunology* 2011;4(2):139-147.
24. Collins MH, Martin LJ, Alexander ES, et al. Newly developedand validated eosinophilic esophagitis histology scoring system and evidence thatit outperforms peak eosinophil count for disease diagnosis and monitoring. *Dis Esophagus*. 2017; 30:1-8.

4.8 Tables

Table 1: Clinical Data of Eosinophilic Esophagitis (EoE) *versus* Epigastralgia

	EoE (n:17)	Epigastralgia (n:17)	P
Gender*	10 M : 7 F	10 M : 7 F	1.0000
Mean age (years)&	11	10	0.0794
History of allergy (cases)&	14	4	0.0016 [!]
Mean eosinophils (eosinophils/hpf)*	157.88	1.29	< 0.0001 [!]

EoE: eosinophilic esophagitis

M: male

F: female

* Paired *t*-test

& Fisher's exact test

[!]*p*<0.05

Table 2. Morphological and immunohistochemical findings of Eosinophilic Esophagitis (EoE) *versus* Epigastralgia

Morphological findings/ Groups	EoE (n:17)	Epigastralgia (n:17)	P
Papillary elongation	17	0	< 0.0001*
Basal cell layer hyperplasia	17	0	< 0.0001*
Dilated intercellular space	17	5	< 0.0001*
Microabscesses	9	0	0.0009*
CD1a expression	10	0	0.0003*
Eosinophilic infiltration in the mucosa	17	5	<0.0001*

Fisher's exact test. * $p<0.05$

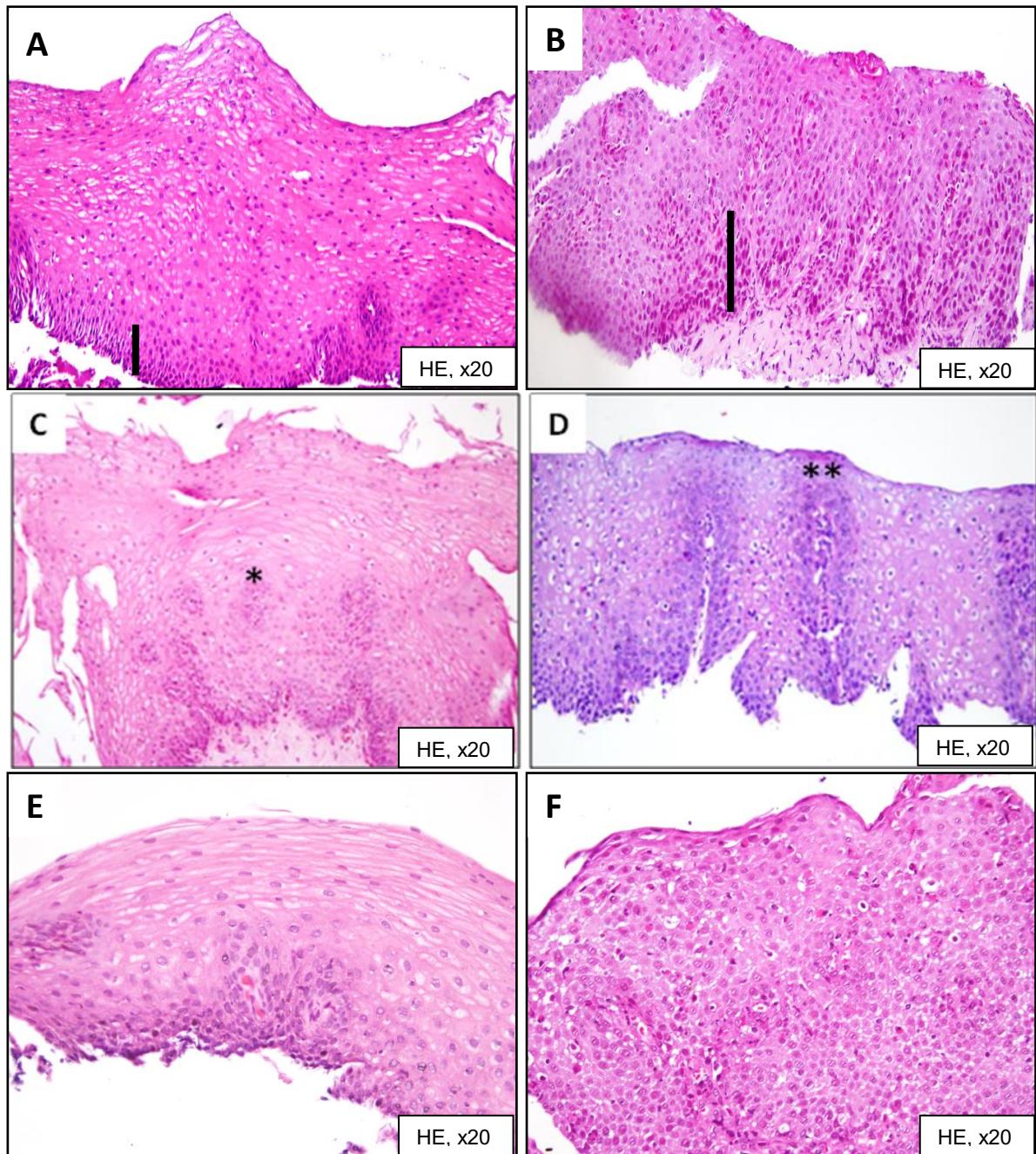
Table 3. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of morphological and immunohistochemical findings for Eosinophilic Esophagitis in children and adolescents submitted to upper gastrointestinal endoscopy in the cohort studied.

Findings	True negative	True positive	False positive	False negative	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
Papillary elongation	17	17	0	0	100	100	100	100
Basal cell layer hyperplasia	17	17	0	0	100	100	100	100
Spongiosis	12	17	5	0	100	70.6	77.3	100
Microabscess	17	9	0	8	52.9	100	100	68.0
CD1a expression	17	10	0	7	58.8	100	100	70.8

Table 4. Comparison of the mean number of eosinophils found in the esophageal mucosa with presence and intensity of morphological and immunohistochemical changes observed in patients with EoE.

Morphological/immunohistochemical finding	Alteration		P
Papillary elongation	Mild n:5 Eo: 83.50 ± 27.13	Severe n:12 Eo: 194.3 ± 44.66	0.1901
Basal cell layer hyperplasia	Mild n:5 Eo: 43.20 ± 22.28	Severe n:12 Eo: 205.7 ± 41.44	0.0281*
Spongiosis	Mild n:4 Eo: 54.75 ± 32.83	Severe n:13 Eo: 189.6 ± 40.92	0.1014
Microabscesses	No n:8 Eo: 61.75 ± 17.44	Yes n:9 Eo: 243.3 ± 49.03	0.0047*
CD1a expression.	Absent n:7 Eo: 121.6 ± 36.79	Present n:10 Eo: 183.3 ± 53.46	0.4003

Unpaired *t*-test **p*<0.05

4.9 Figure

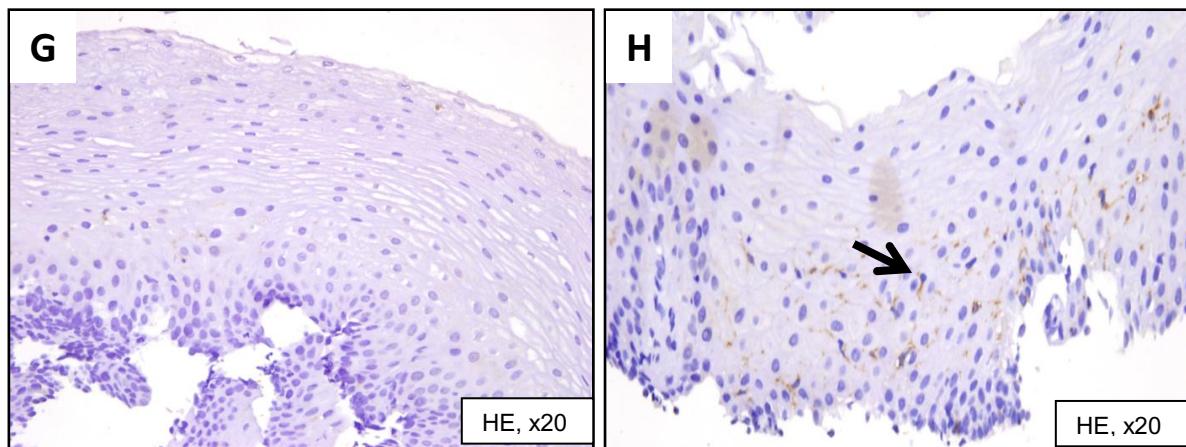


Figure 1. Morphological characteristics found (A-H). A. Normal esophageal mucosa showing features showing normal thickness of the basal layer (small vertical beam). B. Esophageal mucosa showing marked enlarged basal cell hyperplasia (big vertical beam) in an eosinophilic esophagitis (EoE) patient. C. Normal papilla mucosa (*). D. Mucosa with pronounced papilla elongation in an EoE patient (**). E. Normal space between epithelial cells F. Mucosa with large intercellular space in an EoE patient. G. Normal immunohistochemical expression of Cd1a in the mucosa mucosa. H. Marked increase of immunohistochemical expression of Cd 1a, above the basal and parabasal layer (arrow) in an EoE patient.

4.10 Carta ao editor

Dear Editor

We respectfully submit our manuscript entitled “Histopathological parameters on esophageal specimens from childhood are useful to differentiate eosinophilic esophagitis and other diseases requiring upper digestive endoscopies” for publication in the Histopathology. This paper presents the comparison between morphological features found in the biopsies analysis of patients with eosinophilic esophagitis diagnosis and other diseases leading to upper digestive endoscopy in pediatric patients.

The study shows differences in clinical backgrounds, morphological aspects and immunohistochemical findings between these groups. The paper also presents the sensitivity, specificity, PPV and NPV for each morphological aspect in the eosinophilic esophagitis diagnosis.

On behalf of all the authors, I verify that this work is not under consideration in any other journal and has not been published, or accepted for publication elsewhere.

Sincerely

Gesmar Rodrigues Silva Segundo, MD PhD

Pediatrics Department, Faculty of Medicine

Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama- Bloco 2H

Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

CEP: 38400-920

Email: gesmar@famed.ufu.br

REFERÊNCIAS

- ACEVES, S. S. Remodeling and Fibrosis in Chronic Eosinophil Inflammation. **Dig Dis**, v. 32, p. 15-21, 2014.
- ACEVES, S. S.; et al. A symptom scoring tool for identifying pediatric patients with eosinophilic esophagitis and correlating symptom with inflammation. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 103, p. 401-406, 2009.
- AHMED, A.; MATSUI, S.; SOETIKNO, R. A novel endoscopic appearance of idiopathic eosinophilic esophagitis. **Endoscopy**, California, v. 32, n. 6, p. 33, 2000.
- ATTWOOD, S. E. A.; SMYRK, T. C.; DEMEESTER, T. R. Eosinophilic asthma-episodic dysphagia with eosinophilic infiltrates. **Gut**, v. 30, p. 1493, 1989.
- ATWOOD, S. E.; et al. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. **Dig Dis Sci**, v. 38, p. 109-116, 1993.
- BOECHAT, J. L.; et al. Eosinophilic esophagitis prevalence in adults with dysphagia or heartburn: preliminary results. **World Allergy Organization Journal**, v. 8, p. A251, 2015.
- CALDWELL, J. M.; et al. Glucocorticoid-regulated genes in eosinophilic esophagitis: a role for FKBP51. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, p. 879-888, 2010.
- CARR, S.; WATSON, W. Eosinophilic esophagitis. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. e, p. 2-8, 2011.
- CHEHADE, M.; et al. Esophageal subepithelial fibrosis in children with eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastro Nutr**, v. 45, p. 319-328, 2007.
- COLLINS, M. H. Histopathology of Eosinophilic Esophagitis. **Dig Dis**, v. 32, p. 68-73, 2014.

CROESSE, J. et al. Clinical and endoscopic features of eosinophilic esophagitis in adults. **Gastrointest Endoscop**, Australia, v. 58, n. 4, p. 516-522, 2003.

DALBY, K.; et al. Eosinophilic Oesophagitis in Infants and Children in the Region of Southern Denmark: A Prospective Study of Prevalence and Clinical Presentation. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v. 51, p. 280-282, 2010.

DEBROSSE, C. W.; et al. Identification, epidemiology, and chronicity of pediatric esophageal eosinophilia. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, p. 112-119, 2010.

DELLON, E. S. et al. Variability in Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagiis: a Systematic Review. **Am J Gastroenterol**, North Carolina, v. 102, n. 1, p. 14, 2007.

DELLON, E. S.; et al. Clinical, endoscopic, and histologic findings distinguish eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 7, p. 1305-1313, 2009.

DELLON, E. S.; et al. Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in the United States. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 79, n. 4, p. 577-585, 2013.

DELLON, E. S.; LIACOURAS, C. A. Advances in clinical management of eosinophilic esophagitis. **Gastroenterology**, v. 147, p. 1238-1254, 2014.

DENARDI, F. G.; RIDDELL, R. H. Esophagus. In: STACEY E. MILLS. **Histology for pathologists**. 4. ed. Estados Unidos: Lippincott, 2012. p. 565-588.

FIOCCA R, MASTRACCI L, MILIONE M, PARENTE, P, SAVARINO V. Microscopic esophagitis and Barrets's esophagus: The histology report. **Dig Liver Dis**, v. 43, p. 319-330, 2011.

FURUTA, G.T. et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recomendations for diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342-1363, 2007.

GRIN, A.; STREUTKER, C. J. Esophagitis. Old Histologic Concepts and New Thoughts. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, p. 723-729, 2015.

JIAO, D.; et al. Similarities and Differences Among Eosinophilic Esophagitis, Proton-Pump Inhibitor-Responsive Esophageal Eosinophilia, and Reflux Esophagitis: Comparisons of Clinical, Endoscopic, and Histopathological Findings in Japanese Patients. **J. Gastroenterol**, v. 522, p. 203-210, 2017.

LANDRES, R. T.; KUSTER, G. G. R.; STRUM, W. B. Eosinophilic esophagitis in a patient with vigorous achalasia. **Gastroenterology**, California, v. 74, n. 6, p. 1298-1300, 1978.

LIACOURAS, C. A. et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. **J Allergy Clin Immunol**, USA, v. 128, n. 1, p. 3-20, 2011.

LUCENDO, A. J.; et al. Manometric findings in adult eosinophilic oesophagitis: a study of 12 cases. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 5, p. 417-424, 2007.

MOAWAD, F. J.; et al. Eosinophilic esophagitis: current perspectives from diagnosis to management. **Ann. N. Y. Sci**, v. 1380, p. 204-217, 2016.

MULDER, D.; JUSTINICH, C. J. Understanding eosinophilic esophagitis: the cellular and molecular mechanisms of an emerging disease. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 2, p. 139-147, 2011.

ORLANDO, R. C. POWELL, D. W.; CARNEY, C. N. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. **J. Clin Invest**, v. 68, p. 286-293, 1981.

PAPADOPOULOU, A. et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis em chidhood. **JPGN**, v. 58, n. 1, p. 107-118, 2014.

PEETIUK, S. P.; MILLER, C. K.; KAUL, A. Eosinophilic esophagitis in infants and toddlers. **Dysphagia**, Cincinnati, v. 22, p. 44-48, 2007.

PHILPOTT, H.; et al. Eosinophilic esophagitis: a clinicopathological review. **Pharmacol Ther**, v. 146, p. 12-22, 2015.

PICUS, D.; FRANK, P. H. Eosinophilic esophagitis. **AJR**, Chicago, v. 136, n. 5, p. 1001-1003, 1981.

PRASAD, G. A.; et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 7, p. 1055–1061, 2009.

PUTNAM, P. E. Evaluation of the child who has eosinophilic esophagitis. **Immunol Allergy Clin N Am**, Cincinnati, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2009.

RAVELLI, A. M.; et al. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, n. 5, p. 510-5, 2006.

RAVELLI, A.; et al. Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 59, p. 589-593, 2014.

SAVARINO, E.; et al. Clinical, endoscopy, histological and radiological characteristics of Italian patients with eosinophilic oesophagitis. **Dig Liver Dis**, v. 47, n. 12, p. 1033-1038, 2015.

SCHOEPFER, A. M.; et al. Delay in Diagnosis of Eosinophilic Esophagitis Increases Risk for Stricture Formation in a Time-Dependent Manner. **Gastroenterology**, v. 145, p. 1230-1236, 2013.

SCHOEPFER, A. M.; et al. Development and validation of a symptom-based activity index for adults with eosinophilic esophagitis. **Gastroenterol** v. 147, p. 1255-1266, 2014.

SINGLA, M. B.; et al. Early comparison of inflammatory vs. fibrostenotic phenotype in eosinophilic esophagitis in a multicenter longitudinal study. **Clin. Transl. Gastroenterol** v. 6, p: e 132, 2015.

SPERGEL, J. M. et al. Predictive value for skin prick test and atopy patch test for eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, Philadelphia, v. 119, n. 2, p. 509-511, 2007.

STEINER, S. J.; KERNEK, K. M.; FITZGERALD, J. F. Severity of basal cell hyperplasia differs in reflux versus eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, p. 506-509, 2006.

STRAUMANN A.; et al. Idiopathic eosinophilic esophagitis: a frequently overlooked disease with typical clinical aspects and discrete endoscopic findings. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 124, p. 1419-1429, 1994.

TEITELBAUM, J. E.; et al. Eosinophilic esophagitis in Children: Immunopathological Analysis and Response to Fluticasone Propionate. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1216-1225, 2002.

TOBEY, N. A.; et al. Dilated intercellular spaces: A morphological feature of acid reflux damaged human esophageal epithelium. **Gastroenterol**, v. 111, p. 1200-1205, 1996.

VINDIGNI, C.; et al. Eosinophilic esophagitis: an Italian experience. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 2012, p.15-19, 2010.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase na camada basal.

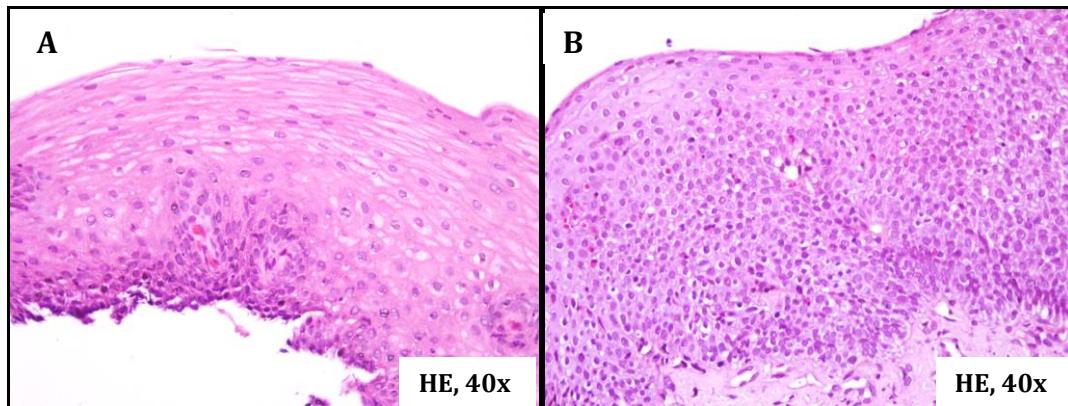


Figura 1 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico encontrados entre os casos analisados. A. Características de normalidade. B. Epitélio com hiperplasia acentuada de células da camada basal. (Fonte: produção do próprio autor)

Figura 2 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase no alongamento de papilas.

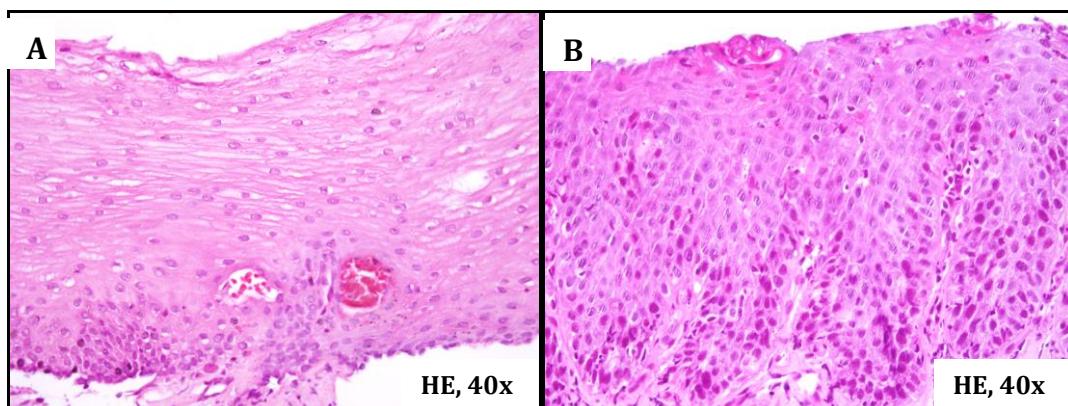


Figura 2 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico encontrados entre os casos analisados. A. Características de normalidade. B. Epitélio com alongamento acentuado de papilas. (Fonte: produção do próprio autor)

Figura 3 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico com ênfase na espongiose.

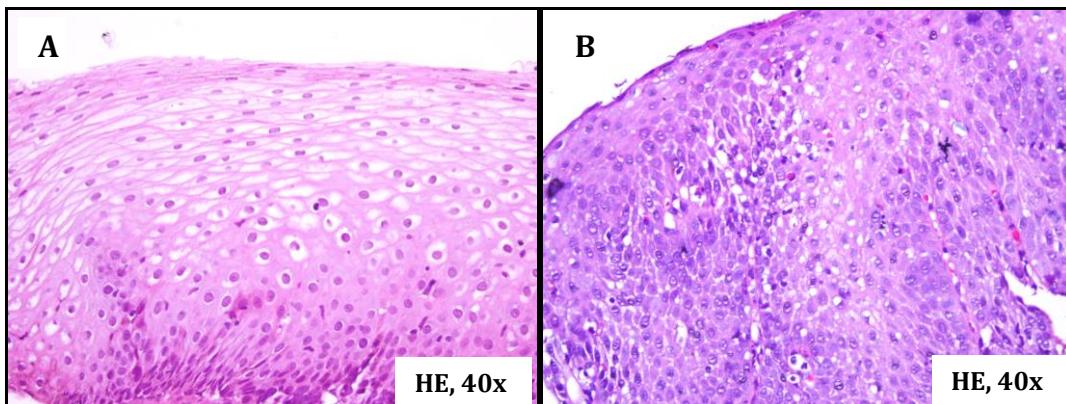


Figura 3 - Comparação entre cortes histológicos de epitélio esofágico encontrados entre os casos analisados. A. Características de normalidade. B. Epitélio com grande espongiose. (Fonte: produção do próprio autor)

Figura 4 - Fotomicrografia de microabscesso de eosinófilos no epitélio esofágico.

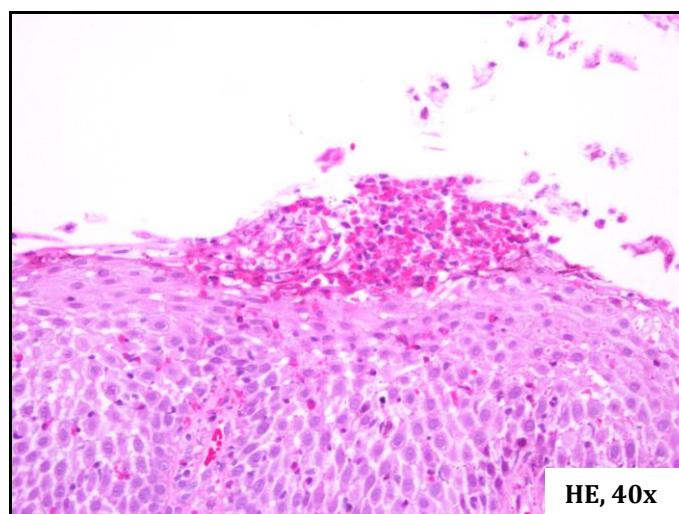


Figura 4 - Fotomicrografia de epitélio esofágico mostrando evidente microabscesso de eosinófilos, com acúmulo de mais de quatro eosinófilos. (Fonte: produção do próprio autor)

Figura 5 - Comparação entre cortes histológicos de imuno-histoquímica do epitélio esofágico para células apresentadoras de抗ígenos.

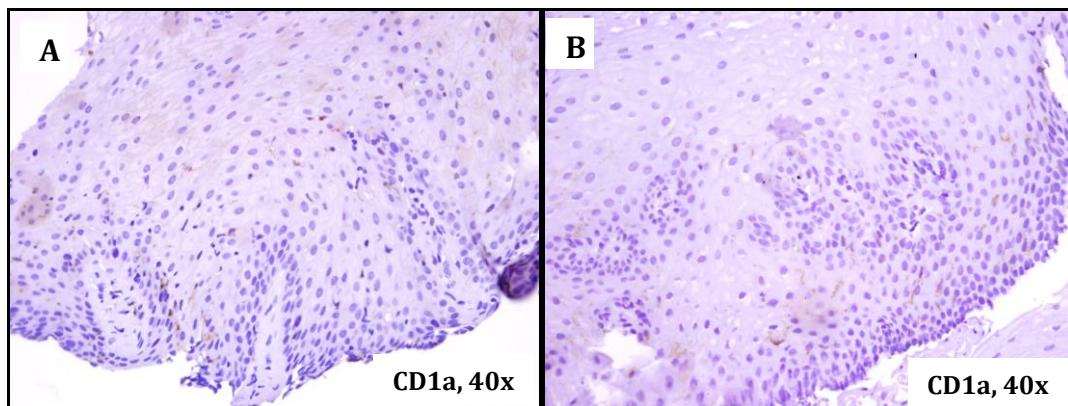


Figura 5 - Fotomicrografia de cortes histológicos de epitélio esofágico analisado no estudo, submetidos a reação imuno-histoquímica para análise da expressão de CD1a. A. Epitélio mostrando expressão habitual do CD1a. B. Epitélio mostrando expressão aumentada do CD1a. (Fonte: produção do próprio autor)

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **“Estudo de biomarcadores como preditores de atividade inflamatória em pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de Esofagite Eosinofílica”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Gesmar Rodrigues Silva Segundo, Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende, Juliana Salomão Daud, Cristina Palmer Barros, Tânia Machado de Alcântara, Jair Pereira da Cunha Junior, Luiz Ricardo Goulart Filho, Ignez Calcaloro e Ernesto Aiko Taketomi.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender melhor a inflamação que acontece no esôfago dos pacientes com essa doença.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Juliana Salomão Daud no momento da sua consulta no Ambulatório de Alergia Alimentar ou Gastroenterologia Infantil do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação, durante uma endoscopia e biópsia que já estão programadas para avaliação da doença do menor pelo qual o senhor é responsável, serão realizados exames mais detalhados nas biópsias. Também serão coletados 1 ml de saliva e 0,1ml de muco (secreção de dentro do esôfago) durante a endoscopia para exames mais detalhados. Você também responderá uma entrevista com informações sobre o paciente e a doença (idade, sexo, tempo de doença, sintoma, presença de alergias).

Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a identidade do menor será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos são aqueles que podem acontecer durante o exame de endoscopia (que já está marcada, independentemente dessa pesquisa). Os benefícios serão entender melhor a inflamação que acontece no esôfago desses pacientes e melhorar o tratamento dessa doença.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com: Juliana Salomão Daud, Gesmar Rodrigues Silva Segundo ou Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende, no Ambulatório de Pediatria da Universidade Federal de Uberlândia (Av. Pará s/n; fone: 32182136). Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, dede 200.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor _____ consinto na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido.

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

APÊNDICE B – Termo de Assentimento

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “**Estudo de biomarcadores como preditores de atividade inflamatória em pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de Esofagite Eosinofílica**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Gesmar Rodrigues Silva Segundo, Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende, Juliana Salomão Daud, Cristina Palmer Barros, Tânia Machado de Alcântara, Jair Pereira da Cunha Junior, Luiz Ricardo Goulart Filho, Ignez Calcaloro e Ernesto Aiko Taketomi.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender melhor a inflamação que acontece no esôfago dos pacientes com essa doença.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Juliana Salomão Daud no momento da sua consulta no Ambulatório de Alergia Alimentar e Gastroenterologia Infantil o Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação, durante uma endoscopia e biópsia que já estão programadas para a avaliação da sua doença, serão realizados exames mais detalhados nas biópsias. Também serão coletados 1 ml de saliva e 0,1 ml de muco (secreção de dentro do esôfago) durante a endoscopia para exames mais detalhados. Você também responderá uma entrevista com informações sobre o paciente e a doença (idade, sexo, tempo de doença, sintoma, presença de alergias).

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos são aqueles que podem acontecer durante o exame de endoscopia (que já está agendada independentemente dessa pesquisa). Os benefícios serão entender melhor a inflamação que acontece no esôfago dos pacientes e melhorar o tratamento dessa doença.

Mesmo seu responsável legal tendo consentido na sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não desejar. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Esclarecimento ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Juliana Salomão Daud, Gesmar Rodrigues Silva Segundo ou Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende, no Ambulatório de Pediatria da Universidade Federal de Uberlândia: Av. Pará s/n; fone: 32182136 .Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, dede 20.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido. _____

Participante da pesquisa

ANEXO A - Parecer Consustanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de biomarcadores como preditores de atividade inflamatória em pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de Esofagite Eosinofílica

Pesquisador: Gesmar Rodrigues Silva Segundo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37330414.3.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 887.499

Data da Relatoria: 13/11/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa propõe a análise comparativa de marcadores de atividade inflamatória (biomarcadores) entre pacientes com diagnóstico de Esofagite Eosinofílica (EEo) e pacientes com Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) e Dor Abdominal (DA).

No período de junho de 2015 a junho de 2017, os pacientes pediátricos e adolescentes (até 18 anos) com diagnóstico de EEo e em acompanhamento no Ambulatório de Alergia Alimentar da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) serão convidados para participar do estudo.

Consideram uma amostra elegível de 30 indivíduos com diagnóstico de EEo. O número mínimo para realizar a pesquisa será de 25 pacientes com EEo, baseado em estudo publicado com população avaliada no Ambulatório de Alergia Alimentar do HC-UFU, onde em dois anos foram avaliados 35 pacientes com esse diagnóstico (REZENDE E.R.M.A., et al., 2014). Justificam o número mínimo em virtude a possibilidade de perdas (pacientes acima de 18 anos, mudança de domicílio ou recusa em participar da pesquisa). Os dados obtidos em indivíduos com EEo serão comparados àqueles observados em 10 indivíduos com DRGE e 10 pacientes com DA acompanhados nos Ambulatórios de Alergia Alimentar de Gastroenterologia Infantil da UFU, e que necessitarão de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) e biópsia por indicação clínica independentemente da pesquisa a ser realizada. Assim, o número total de indivíduos para realização da pesquisa será em torno de

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLANDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

J. M. L. e R. F. L.

Página 01 de 06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 887.499

50. Os pacientes e seus responsáveis serão abordados por um membro da equipe de pesquisadores, o qual, não é o responsável direto pelo atendimento médico, para evitar qualquer constrangimento por parte do paciente.

Após o aceite e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pais ou responsáveis e o Termo de Assentimento (TA) para os maiores de 13 anos e menores de 18 anos, o paciente ou os responsáveis responderão um questionário com dados referentes a idade, sintomas, tempo de evolução da doença, doenças atópicas e tratamentos realizados. O questionário será codificado por um número. O paciente será encaminhado para agendar um exame de EDA, o qual é rotineiro para o diagnóstico e acompanhamento desses pacientes (PAPADOPOLOU, A. et al., 2014). Durante o exame de EDA será coletado quatro fragmentos microscópicos para análise histológica (dois no terço médio e dois no terço superior do esôfago). A realização de biópsias esofágicas também é rotineira para o diagnóstico de EEO e para acompanhamento do tratamento desses pacientes (FURUTA, G. T. et al., 2007; LIACOURAS, C. A. et al., 2011.; PAPADOPOLOU, A. et al., 2014). Os fragmentos de mucosa esofágica obtidos por EDA serão processados para análise histopatológica. Será realizada uma análise histológica detalhada e posteriormente uma análise imunohistoquímica com emprego de biomarcadores (Proteína Catiónica Eosinofílica e Proteína Básica Principal) para avaliar atividade inflamatória. Também será realizada uma análise da presença desses biomarcadores além da calgranulina em amostras de saliva (1,0 ml) e muco (0,1 ml) coletadas durante o procedimento endoscópico. Dados referentes ao diagnóstico e doenças atópicas serão pesquisados em prontuários. Em todas as etapas da pesquisa será garantido o sigilo da identidade do participante da pesquisa. A Esofagite Eosinofílica (EEO) é uma entidade clínica patológica emergente, cujo reconhecimento tem cerca de três décadas (FRANCIOSI, 2009). A EEO não possui incidência e prevalência conhecida no Brasil, sendo relatada em casos isolados ou série de casos publicados em diversos centros (CURY; SCHARAMINAM; FAINTUCH, 2004; FERREIRA et al., 2008; REZENDE et al., 2014). A EEO é definida como uma desordem inflamatória crônica primária do esôfago, caracterizada por sintomas de disfunção do trato gastrointestinal superior, associada a um aumento de eosinófilos intraepiteliais na mucosa esofágica, em número superior a quinze eosinófilos por grande campo de aumento (GCA), em mais de um fragmento de biópsia obtido durante o exame de endoscopia digestiva alta (EDA), e pela avaliação da Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), evidenciada por um estudo de monitorização do pH ácido do esôfago (pHmetria de 24 h) normal ou falência no tratamento clínico com altas doses de inibidor de bomba de prótons (IBP), na ausência de outras síndromes eosinofílicas (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLANDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Página 02 de 06

A handwritten signature in cursive ink, appearing to read 'Dr. Luiz Henrique da Fonseca Melo.'



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 887.499

et al., 2011; PAPADOPOLOU et al., 2014). A EEE apresenta patogenia pouco conhecida, porém estudos apontam semelhanças entre o processo inflamatório observado no esôfago e aquele descrito na Asma e na Dermatite Atópica (ARORA; YAMAZAKI, 2004). O mecanismo fisiopatológico envolve células epiteliais ativadas por alérgenos alimentares ou inalantes e através de uma cascata inflamatória com a participação da Eotaxina-3 e das Interleucinas 4, 9 e 13, atraem os eosinófilos para a mucosa do esôfago e promovem sua degranulação com consequente liberação de produtos proteicos como a proteína catiônica eosinofílica (PCE), a proteína básica principal (PBP), a peroxidase eosinofílica e outras substâncias que são lesivas para mucosa esofágica, resultando em fibrose e consequentemente dismotilidade esofágica observadas nos pacientes (ROMAN et al., 2013). A calgranulina B é parte de um grupo de proteínas (S100) as quais são liberadas pelos granulócitos mastócitos e participam na resposta imune inata amplificando reações inflamatórias desencadeadas por fatores derivados dos patógenos, no caso da infecção, ou desencadeadas por fatores endógenos em estados inflamatórios (FOELL et al., 2007). A possibilidade da utilização de marcadores não invasivos para avaliar a atividade inflamatória em pacientes com EEE já foi revisada em algumas publicações (GUPTA S.K., 2008). Os dados obtidos em indivíduos com EEE serão comparados aqueles observados em indivíduos com DRGE e DA acompanhados nos Ambulatório Alergia Alimentar e Gastroenterologia Infantil da UFU, e que necessitarão de EDA e biópsia por indicação clínica independentemente da pesquisa a ser realizada. Dados relacionados ao paciente, diagnóstico, sintomas e tratamento serão coletados através de um questionário e análise de prontuários. O sigilo do participante será sempre garantido pelos pesquisadores. Um exame de EDA e biópsia, rotineiros para o diagnóstico e acompanhamento desses pacientes serão realizados (PAPADOPOLOU, A. et al., 2014).

A amostra será de 50 pacientes, sendo 30 com diagnóstico EEE comparados com 10 pacientes com DRGE e 10 pacientes com dor abdominal os quais necessitarão de EDA e biópsia por indicação clínica independentemente da pesquisa a ser realizada. A amostra será de conveniência em virtude ao não conhecimento da prevalência dessa doença (EEE) em nosso meio, por se tratar de uma entidade relativamente rara e o pelo fato dos Ambulatórios de Alergia Alimentar e Gastroenterologia Infantil do HC-UFU serem os serviços de referência para acompanhamento e tratamento desses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o projeto:

Objetivo principal: Avaliar a atividade inflamatória em fragmentos de mucosa esofágica de pacientes pediátricos e adolescentes com Esofagite Eosinofílica (EEE) em acompanhamento no

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLANDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4385 E-mail: cep@propp.ufu.br

Página 03 de 06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 887.499

Ambulatório de Alergia Alimentar da Universidade Federal de Uberlândia.

Objetivo Secundário: a. Descrever os achados histopatológicos encontrados nas biópsias esofágicas de pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de EEE submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta (EDA). b. Avaliar o número de eosinófilos encontrados nas biópsias esofágicas de pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de EEE submetidos ao exame de EDA. c. Avaliar a expressão proteína catiônica eosinofílica (PCE) e da proteína básica principal (PBP) nos fragmentos de biópsia esofágica. d. Dosar a PCE, a PBP e a calgranulina B no muco esofágico e na saliva. e. Correlacionar o nível da PCE e da PBP com o número de eosinófilos encontrados na análise histológica dos pacientes com diagnóstico de EEE submetidos ao exame de EDA. f. Correlacionar o nível da PCE e da PBP com achados endoscópicos e sintomas clínicos observados nos pacientes com diagnóstico de EEE submetidos ao exame de EDA. g. Analisar a expressão de CD1a na mucosa esofágica dos pacientes com diagnóstico de EEE submetidos a EDA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos:

a) Identificação dos participantes de pesquisa: com relação a esse risco, os pesquisadores realizarão identificação numérica dos questionários e das amostras de biópsia, muco esofágico e saliva utilizadas no estudo. b) Riscos durante o procedimento endoscópico: os riscos durante o procedimento de EDA é de 1,7%, sendo a EDA com realização de biópsia considerada um procedimento seguro (SILVA, M. G. D. e MILWARD, G., 2000; SOUZA, M. C. et al., 2014). Esse riscos sempre são observados pelo profissional executor do exame antes da realização do mesmo. A EDA e a análise histológica (biópsia) é rotineira para o diagnóstico e seguimento do paciente com EEE e para alguns pacientes com DRGE e dor abdominal e será realizada nesses pacientes por indicação clínica independentemente dessa pesquisa.

Benefícios:

Os benefícios serão a possibilidade de otimização do tratamento dos pacientes com diagnóstico de EEE pela utilização dos marcadores de atividade inflamatória como preditores de atividade da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP UFU considera que o protocolo está bem escrito, tem relevância científica e justifica sua condução com seres humanos.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144

UF: MG Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Jeanne Lúcia de Souza Lobo
Página 04 de 06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 887 499

Tamanho da Amostra no Brasil: 50 participantes.

Orçamento Total em R\$ 8.473,00. Financiamento Próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Barroso

Resoluções

Necessita Apreciação da CONFER.

Não

Considerações Finais e critérios do GEF

Data para entrega do Relatório Parcial ao CEP/UEU: dia 15 de outubro de 2015

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: dezembro de 2015.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: dezembro de 2016.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: dezembro de 2011

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA TUDO SE MANTER CORRETO.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Association for Child and Adolescent Mental Health.

- O CEP/UFU lembra que:

 - a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
 - b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
 - c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cor@...

íciplina: UBERLANDIA
11 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br


Página 01

Pg : 25 / 30



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 887.499

Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

[Handwritten signature of Sandra Terezinha de Farias Furtado]

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
 (Coordenador)

UBERLANDIA, 26 de Novembro de 2014

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br