

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

**BIOMARCADORES DE COMPROMETIMENTO DA BARREIRA EPITELIAL  
ESOFÁGICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ESOFAGITE  
EOSINOFÍLICA**

**ÉRICA RODRIGUES MARIANO DE ALMEIDA REZENDE**

**DOUTORADO  
2019**

**ÉRICA RODRIGUES MARIANO DE ALMEIDA REZENDE**

**BIOMARCADORES DE COMPROMETIMENTO DA BARREIRA EPITELIAL  
ESOFÁGICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE  
ESOFAGITE EOSINOFÍLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo

**UBERLÂNDIA - MG  
2019**

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

---

R467b  
2019

Rezende, Érica Rodrigues Mariano de Almeida, 1970

Biomarcadores de comprometimento da barreira epitelial esofágica em crianças e adolescentes com diagnóstico de esofagite eosinofílica [recurso eletrônico] / Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende. - 2019.

Orientador: Gesmar Rodrigues Silva Segundo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1230>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Esofagite eosinofílica. 3. Biomarcadores. 4. Doenças crônicas. I. Silva Segundo, Gesmar Rodrigues, 1973, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende

### **BIOMARCADORES DE COMPROMETIMENTO DA BARREIRA EPITELIAL ESOFÁGICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ESOFAGITE EOSINOFÍLICA**

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

### **Banca Examinadora**

---

Titular: Profa. Dra. Elisa de Carvalho  
Universidade Federal de Brasília - DF

---

Titular: Profa. Dra. Magda Regina S. Moura  
Faculdade de Medicina IMEPAC - Araguari MG

---

Titular: Profa. Dr. Carlos Henrique Martins Silva  
Universidade Federal de Uberlândia - MG

---

Titular: Profa. Dra. Daniela Marques de Lima Mota Ferreira  
Universidade Federal de Uberlândia - MG

Ao meu amado filho Luiz Fernando!  
Aos meus pacientes!

## AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus, o Grande Criador!

Ao meu querido marido Marco Túlio, parceiro de tantos anos, pelo entendimento e compreensão dos meus ideais.

Ao meu saudoso pai e grande amigo, Álvaro, que tanto me ensinou em vida e também em seu sofrimento, a lição maior de humildade e resiliência.

À minha mãe América, toda a minha afeição!

Aos meus irmãos de sangue e afetivos Carla, Alexander, Romeu, Marília, meus sobrinhos Pedro, Artur, Clara, Stella e Helena. Vocês, Marco Túlio e Luiz Fernando são a minha melhor parte!

Chico, Juca e Expedito, meus parceirinhos de vida!

Dra. Mariza Rodrigues de Faria, pelo auxílio na realização dos exames endoscópicos. Minha gratidão nunca caberá em palavras!

Dra. Juliana Salomão Daud, pela realização da análise histopatológica.

Ignez Canddelori, pela realização do estudo imuno-histoquímico.

Flávia Araújo Alves, pelo trabalho estatístico.

Prof. Jair Cunha Junior, pelo fundamental incentivo!

Profa. Aparecida Helena Baldo Guimarães, por disponibilizar o laboratório de patologia para realização da análise microscópica.

Lívia Oliveira, pela correção gramatical e das normas bibliográficas.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Gisele e Viviane, pela disponibilidade e atenção.

As colegas e parceiras da equipe de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de Uberlândia, Tatyana Cunha Borges Cock, Cristina Palmer Barros e Geisa Neusa de Miranda.

Aos profissionais do Serviço de Patologia e Endoscopia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

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

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Gesmar Rodrigues da Silva Segundo, que generosamente vem contribuindo para a Alergia e Imunologia Pediátrica, estruturando um Serviço, auxiliando os pequenos pacientes, compartilhando e replicando o conhecimento.

Obrigada!

*“O conhecimento é como o fogo, quanto mais se divide mais se multiplica!”*

*“Desistir?*

*Eu já pensei seriamente nisso,  
mas nunca me levei realmente a sério.  
É que tem mais chão nos meus olhos,  
do que o cansaço nas minhas pernas.*

*Mais esperança nos meus passos,  
do que tristeza nos meus ombros.*

*Mais estrada no meu coração,  
do que medo na minha cabeça”.*

Cora Coralina

## RESUMO

**Introdução:** A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença crônica, imunomedida, caracterizada por sintomas de disfunção esofágica associada a um infiltrado inflamatório predominantemente por eosinófilos (15 eosinófilos/campo de grande aumento), na ausência de outras síndromes eosinofílicas. É uma doença emergente com aumento de incidência e prevalência mundial. Acomete predominantemente pacientes em idade escolar, do sexo masculino. Há forte associação com doenças atópicas, em especial, a alergia alimentar. A patogenia da EoE não está completamente esclarecida. A interação entre fatores genéticos, ambientais e, principalmente, o papel da barreira epitelial, com destaque para as proteínas responsáveis pela arquitetura e funcionalidade do epitélio esofágico, têm se tornado relevantes no entendimento do processo inflamatório dessa doença. A doença possui caráter crônico, e há perda da funcionalidade do órgão por remodelamento esofágico, com impacto na qualidade de vida da família e do paciente afetado. O melhor conhecimento do papel das proteínas-chave como marcadores de atividade inflamatória na barreira epitelial, pode somar no entendimento dessa doença de diagnóstico e manejo desafiadores. **Objetivo:** avaliar a expressão das proteínas E-caderina e filagrina como biomarcadores de atividade inflamatória da EoE, em pacientes pediátricos e adolescentes. **Pacientes e Métodos:** Fragmentos de biópsia esofágica de 24 pacientes com EoE e 17 controles foram coletados por exame de endoscopia digestiva alta e analisados com relação a contagem de eosinófilos e achados histológicos. A expressão das proteínas E-caderina e filagrina foi realizada por técnica de imuno-histoquímica. Sintomas, achados endoscópicos, tempo de diagnóstico e tratamento foram observados em registros médicos. **Resultados:** 62,5% dos pacientes com EoE eram do sexo masculino, com mediana de idade de 129,8 meses (+-11,62). A média de eosinófilos foi de 41,5/CGA (33,03-70,39). 45,8% apresentavam alergia alimentar. A E-caderina estava alterada (subexpressa) em 11 (54,1%) dos pacientes com EoE e em 1 (4,1%) dos controles ( $p<0,05$ ). A filagrina não foi expressa na mucosa dos pacientes (com EoE e controle). Os achados endoscópicos, histológicos, sintomas e tempos de evolução da doença nos pacientes com EoE não apresentaram diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação alteração da expressão da E-caderina e filagrina. **Conclusão:** A E-caderina foi subexpressa nos pacientes com EoE, indicando comprometimento de barreira epitelial nesses pacientes. A expressão da filagrina mostrou-se incapaz de sinalizar comprometimento de barreira nos pacientes avaliados. A E-caderina pode ser útil como biomarcador de atividade inflamatória nos pacientes com EoE.

**Palavras-chave:** Esofagite Eosinofílica. Barreira epitelial. Biomarcador. E-caderina. Filagrina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic, immune-mediated disease characterized clinically by symptoms related to esophageal dysfunction and histologically by eosinophil-predominant inflammation (15 eosinophils / high power field). Other eosinophilic syndromes should be excluded. The recognition of this disease is growing, with increased incidence and prevalence in many continents. Male gender faces a strong risk and there is one peak of incidence in older children. The patients usually suffer from a high number of atopic disorders, especially food allergy. The pathogenesis is not completely understood. Genetic and environmental factors and notably the epithelial barrier proteins of the esophageal epithelium have been considered important to understand the inflammatory process. EoE is a chronic disease and the patients could lose their esophageal function due to remodeling. There is a high impact on quality of life. It is important to understand the role of key proteins in the epithelial barrier to help the patients with EoE - one scientific and health challenge. **Objective:** to measure the inflammatory activity in fragments of esophageal biopsies of pediatric and adolescent patients with EoE by the expression of E-cadherin and filaggrin proteins. **Patients and Methods:** 24 patients with EoE and 17 controls were invited to participated in this study. Fragments of esophageal biopsies were collected by upper digestive endoscopy and were analyzed. The number of eosinophils and histological findings were observed. Expression of the E-cadherin and filaggrin proteins was performed by immune-histochemical technique. Symptoms, endoscopic findings, time of diagnosis and treatment were observed in medical records. **Results:** 62.5% of the patients with EoE were male, with median age of 129.8 months (+ -11.62). The mean of eosinophils was 41.5/HPF (33.03-70.39). 45.8% had food allergy. E-cadherin was altered (subexpressed) in 11 (54.1%) patients with EoE and in 1 (4.1%) of the controls ( $p < 0.05$ ). Filaggrin was not found. Regardless the expression of E-cadherin and filaggrin, there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the symptoms, endoscopic and histological findings and disease evolution time in patients with EoE. **Conclusion:** E-cadherin was underexpressed in patients with EoE, indicating epithelial barrier impairment in these patients. Filaggrin expression was unable to signalize barrier impairment in the analyzed patients.

**Keywords:** Eosinophilic esophagitis. Epithelial barrier. E-cadherin. Filaggrin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	(Microscopia 40X-4): Coloração hematoxilina-eosina: (A) alongamento de papilas, (B) hiperplasia da camada basal, (C) espongiose, (D) microabcessos eosinofílicos em pacientes com EoE.....	94
Figura 2 –	E-caderina (40X-normal): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando expressão positiva em toda espessura do epitélio mucoso em paciente com EoE.....	95
Figura 3 –	(E-caderina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando grandes áreas de expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente com EoE.....	95
Figura 4 –	(Filagrina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para filagrina mostrando expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente com EoE.....	96
Figura 5 –	(Filagrina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para filagrina mostrando expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente controle.....	96
Figura 6 –	(Filagrina 40X-4): Fotomicrografia de controle positivo da filagrina na pele, mostrando expressão esperada nas camadas espinhosa e córnea.....	97

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AA	Alergia Alimentar
DA	Dermatite Atópica
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EoE	Esofagite Eosinofílica
EOS	Eosinófilo
FLG	Filagrina
GCA	Grande Campo de Aumento
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
JAM	Moléculas de Adesão Juncional
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSLP	Linfopoetina Estromal Tímica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>16</b>
2.1	HISTÓRICO .....	16
2.2	DEFINIÇÃO.....	18
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.4	PATOGENIA.....	22
2.5	DIAGNÓSTICO.....	27
2.5.1	ASPECTOS CLÍNICOS.....	27
2.5.2	ASPECTOS ENDOSCÓPICOS.....	29
2.5.3	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	30
2.6	TRATAMENTO.....	32
2.6.1	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO .....	32
2.6.1.1	INIBIDOR DE BOMBA DE PRÓTONS (IBP).....	32
2.6.1.2	CORTICOSTEROIDES.....	33
2.6.1.3	OUTRAS MEDICAÇÕES.....	35
2.6.1.4	TRATAMENTO DIETÉTICO.....	35
2.6.1.5	DILATAÇÃO POR ENDOSCOPIA.....	37
2.7	COMPLICAÇÕES E PROGNÓSTICO.....	37
2.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1 “A E-CADERINA PODE SER UM MARCADOR DE COMPROMETIMENTO DE BARREIRA E ESOFAGITE EOSINOFÍLICA?” .....</b>	<b>40</b>
4.1	RESUMO.....	42
4.2	INTRODUÇÃO.....	43
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.4	RESULTADOS.....	47
4.5	DISCUSSÃO.....	52
4.6	BIBLIOGRAFIA.....	56
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2 “EXPRESSÃO DA FILAGRINA NA MUCOSA ESOFÁGICA</b>	

<b>DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ESOFAGITE</b>	
<b>EOSINOFÍLICA.....</b>	<b>64</b>
5.1 RESUMO.....	65
5.2 INTRODUÇÃO.....	66
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
5.4 RESULTADOS.....	70
5.5 DISCUSSÃO.....	73
5.6 REFERÊNCIAS.....	77
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE C – ANÁLISE DE PRONTUÁRIO.....</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE D – ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença emergente, de caráter crônico, caracterizada por sintomas de disfunção esofágica associados a um infiltrado inflamatório com predomínio de eosinófilos (EOS) (LUCENDO et al., 2017).

A percepção da doença tem se tornado maior, bem como a incidência a qual está atualmente em 118 casos/100.000 habitantes (ROBSON et al., 2019). A prevalência agrupada, segundo alguns autores está em torno de 3,7 casos/100.000 habitantes (ARIAS et al.; 2016). Apresenta predileção pelo sexo masculino e pode acometer qualquer faixa etária, com pico em escolares e adultos jovens, sendo evidente a associação com doenças atópicas (SHERRILL et al., 2010; LIACOURAS et al., 2005; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

O diagnóstico é realizado com o quadro clínico associado a alterações endoscópicas e fundamentalmente ao achado histológico, com infiltração do epitélio esofágico de pelo menos 15 EOS/campo de grande aumento (CGA). É importante afastar outras síndromes eosinofílicas como causa da eosinofilia esofágica (LUCENDO et al., 2017).

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) deve ser excluída como causa do processo inflamatório, mas pode ocorrer concomitantemente (DELLON et al., 2018a).

Os sintomas apresentam uma pluralidade de manifestações clínicas, como dificuldades alimentares, vômitos e falência de crescimento em crianças menores. Epigastralgia, disfagia progressiva e impactação com alimentos sólidos é observada em escolares e adolescentes (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2014; DELLON et al., 2018a).

O tratamento é complexo e prolongado, podendo ser medicamentoso e/ou dietético, com utilização de inibidores de bomba de prótons, corticosteroides inalatórios deglutidos, além da exclusão de grupos proteicos da dieta dos pacientes (LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

A participação do EOS no processo inflamatório é múltipla e bem documentada, desde a descrição dos primeiros casos da doença. Essas células exercem funções como apresentadora de抗ígenos, secreção de citocinas e liberam proteínas lesivas ao epitélio no processo de degranulação, sendo reconhecidas como ponto fundamental para o diagnóstico e avaliação da atividade da doença (ABONIA; ROTHENBERG, 2012; DAVIS, ROTHENBERG, 2013; DAVIS, 2018).

A EoE é uma doença imunomedida e a resposta imunológica e inflamatória ainda não está completamente esclarecida. A presença de fatores genéticos e ambientais associados ao

papel da barreira epitelial são os atuais pontos centrais de discussão sobre a patogenia dessa doença (CALDWELL et al., 2017; DAVIS, 2018; BLEVINS et al., 2018)

O estudo das proteínas responsáveis pelas junções celulares, manutenção e integridade do epitélio e da camada córnea, como as claudinas, ocludinas, moléculas de adesão juncional, e-caderina e filagrina, tem sido descrito em várias doenças Th2, inclusive na EoE (SCHLEIMER; BERDNIKOVS, 2017; ROCHMAN; AZOUZ; ROTHEMBERG, 2018; DAVIS, 2018; BLEVINS et al., 2018)

Modificações nessas proteínas, podem ocasionar defeitos do epitélio esofágico com prejuízo para manutenção de sua arquitetura, controle da permeabilidade celular e proteção da sensibilização do indivíduo. Alterações histológicas, como a espongiose, somadas às moleculares, sinalizam o comprometimento dessa barreira, sendo característica do processo inflamatório (ABDULNOUR-NAKHOUL et al., 2013; DAVIS, 2018).

A EoE é uma doença crônica, de laborioso diagnóstico e manejo. Diversos estudos são realizados para melhor entender o processo inflamatório, sua correlação com os sintomas e achados macro e microscópicos. A expressão das proteínas presentes no epitélio esofágico, podem ser úteis para avaliação da atividade inflamatória nessa doença.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Histórico**

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença de reconhecimento recente e crescente nas últimas décadas. A primeira publicação na literatura mundial foi feita por Dobbins, em 1977, com a descrição de um paciente adulto, masculino com histórico de asma e espasmos esofágicos. A avaliação histológica encontrou infiltrado inflamatório eosinofílico (DOBBINS; SHEAHAN; BEHAR, 1977).

Posteriormente, Landres e outros autores publicaram em 1978, novo caso de um adulto, masculino, admitido em um centro médico na Califórnia (EUA), com histórico de epigastralgia, vigorosa acalasia e impactação com alimentos sólidos. Apresentava na investigação eosinofilia periférica e infiltrado histológico no esôfago, com predomínio de EOS. Sugeriu a inclusão do achado de “esofagite eosinofílica” no espectro de síndromes eosinofílicas gastrointestinais (LANDRES; KUSTER; STRUM, 1978).

A marcada eosinofilia esofágica, foi considerada inicialmente por alguns autores como indicativo de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) severa, e novos casos de pacientes com eosinofilia esofágica, na ausência da DRGE, foram considerados idiopáticos e descritos nos anos subsequentes (JOHNSON; DEMEESTER; HAGGITT, 1978; LEE, 1985).

Em 1989, Attwood e colaboradores publicaram o relato de 15 adultos com disfagia e infiltrado eosinofílico no esôfago, sem exposição ácida na pHmetria de 24 horas, afastando o diagnóstico de DRGE. Na ocasião utilizaram o termo “asma do esôfago” para descrever esse achado (ATTWOOD; SMYRK; DEMEESTER, 1989).

Na década de noventa, foi descrita uma doença inflamatória do esôfago com disfunção do órgão e infiltrado eosinofílico com pelo menos 20 EOS/campo de grande aumento (CGA), denominada esofagite eosinofílica, inicialmente referida como EE e posteriormente EoE, para não confundi-la com esofagite erosiva, foi estabelecida como uma nova entidade clínico patológica (ATTWOOD et al., 1993; STRAUMANN et al., 1994).

Com aumento expressivo de relatos de casos de acometimento esofágico por processo inflamatório de predomínio eosinofílico, paralelamente ao crescimento da alergia alimentar no mundo ocidental, em 2007 foram elaboradas as primeiras diretrizes consensuais da EoE. A EoE foi definida como uma doença inflamatória crônica e primária do esôfago, caracterizada por sintomas de disfunção do órgão, associados à presença de infiltrado inflamatório eosinofílico visualizado na biópsia esofágica, após exame de endoscopia digestiva alta (EDA), estabelecido para diagnóstico como  $\geq 15$  EOS/CGA, na ausência da DRGE ou de outras síndromes eosinofílicas.

O diagnóstico inicial da EoE era realizado após afastar a DRGE como causa da eosinofilia esofágica. Uma pHmetria de 24 horas ou um curso de inibidor de bomba de prótons (IBP) em altas doses (2mg/Kg/dia - máximo 80 mg/dia) por 4 semanas, e novo exame endoscópico com manutenção mais de 15 EOS/CGA na avaliação microscópica eram necessários (LIACOURAS et al., 2005; FURUTA et al., 2007).

A alta correlação com outras doenças alérgicas, particularmente a alergia alimentar (AA), foi percebida. Alguns autores observaram melhora clínica e histológica em pacientes com sintomas de DRGE refratários a tratamento e submetidos à dieta de exclusão de grandes grupos alimentares ou dieta exclusiva de aminoácidos, estabelecendo a EoE como uma doença alérgica (KELLY et al., 1995).

O critério condicional para diagnóstico (uso de IBP em altas doses) foi considerado por alguns autores como indicador de uma nova entidade clínica chamada eosinofilia esofágica IBP responsiva, mas posteriormente refutada como síndrome clínica distinta da

EoE, pela similaridade clínica, patológica e genética. Muitos autores ainda consideram um ciclo com IBP como critério diagnóstico para a doença, mas a partir de 2011 os consensos consideram a EoE e a eosinofilia eosfágica IBP responsiva a mesma doença (LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011; DELLON et al., 2013; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

É crescente o interesse pela EoE nas últimas duas décadas. Acesso à plataforma de pesquisa de periódicos indexados e utilizando os descritores esofagite eosinofílica, mostrou 252 publicações desde o seu reconhecimento como entidade clínico patológica até o início do ano 2000. Aumento exponencial foi observado na década seguinte com 2709 publicações, e 7637 periódicos indexados entre os anos de 2010 a 2019, sendo 1222 artigos somente no último ano.

No Brasil, a primeira série de casos foi publicada por Ferreira e colaboradores, sendo expressivo nos últimos anos, o crescimento do diagnóstico dessa doença em nosso meio (FERREIRA et al., 2008).

A EoE, de doença rara, atualmente é considerada emergente, foco de interesse e debate científico mundial, e pelo aspecto crônico, um grande desafio ao clínico e endoscopista, particularmente para diagnóstico e tratamento dos pacientes.

## **2.2. Definição**

EoE é definida como doença crônica, imunomedida do esôfago, caracterizada por sintomas de disfunção eosfágica e histologicamente por um infiltrado inflamatório predominantemente por EOS. Outras causas sistêmicas de infiltração eosinofílica devem ser excluídas. Manifestações clínicas ou patológicas são desaconselhadas a serem interpretadas isoladamente (LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

## **2.3. Epidemiologia**

A prevalência e a incidência são distintas nas faixas etárias avaliadas, nas várias regiões estudadas. Nos países nórdicos da América e Europa, a incidência tem sido relatada em 6 a 13 casos /100000 habitantes (ARIAS; LUCENDO, 2013). Em um estudo de meta-análise publicado por Arias e colaboradores em 2016, a incidência agrupada foi de 3,7 casos/100.000 habitantes por ano com intervalo de confiança de 95%: 1,7-6,5 (ARIAS et al., 2016).

A prevalência, segundo alguns estudos americanos comparados com aqueles do continente europeu, é mais elevada em adultos (ARIAS et al., 2016). A incidência agrupada pode chegar de 22,7 a 28,1 casos/100.000 habitantes (ARIAS et al., 2016). Em publicação recente de Robson e colaboradores (2019), cuja pesquisa envolvia 10619 pacientes, observou-se uma prevalência em cinco anos de estudo de 118 casos/100.000 crianças (ROBSON et al., 2019).

Desde a primeira série de casos publicada por Ferreira e colaboradores no Brasil, tem sido crescente o número de casos em nosso país. Em recente publicação avaliando 4071 EDA em 2651 pacientes, observou-se na região central do Brasil uma prevalência de 1,22 casos por 10.000 habitantes (FERREIRA et al., 2008; GONÇALVES et al., 2018).

A EoE é mais frequente na raça branca e pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais prevalente em adultos jovens até 50 anos. Em crianças, acomete preferencialmente a idade escolar. Atualmente é considerada a maior causa de impactação esofágica e disfagia em escolares e pré-adolescentes (KAPEL et al., 2008; LIACOURAS et al., 2005; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

A prevalência é maior no sexo masculino provavelmente em virtude do achado da variante genética no gene CRLF2 codificador do receptor da linfopoetina estromal tímica localizado no cromossomo X e Y, conferindo um risco duas vezes maior para acometimento desse sexo (SHERRILL et al., 2010; LUCENDO et al., 2017).

Há variações na prevalência dependendo da localização mundial. DELLON e Hirano (2018), em publicação de revisão sobre a epidemiologia e história natural da EoE, consideraram a doença, de maior magnitude na Europa Ocidental, América do Norte e Austrália. Há registros realizados na América do Sul, Turquia, Oriente Médio e Coreia, sendo maior nos países ocidentais em relação àqueles orientais, e está ausente na África subsaariana e Índia (DELLON et al., 2018b; DELLON et al., 2014).

Alguns autores observaram aumento da eosinofilia esofágica em zonas rurais e áreas suburbanas, mas segundo Spergel e colaboradores (2011), nos Estados Unidos a EoE é mais prevalente em zonas urbanas e em clima seco e frio (JENSEN et al., 2014; HURREL; GENTA; DELLON, 2012).

A hereditariedade do comprometimento da EoE é complexa, com alguns genes de susceptibilidade descritos (ROSENBERG et al., 2010; DAVIS, 2018). A possibilidade de pacientes de primeiro grau afetados chega em torno de 40%. Um estudo de *cohort* com 914 pacientes com EoE e 2192 familiares de primeiro grau observou um risco de acometimento em aproximadamente 2% (DAVIS, 2018; DAVIS, 2014; ALEXANDER et al., 2014).

Os pacientes com EoE, segundo publicações, apresentam fenótipo atópico em torno de 50 a 80%, com concomitância de doenças alérgicas como dermatite atópica (DA), asma, rinite alérgica, síndrome da alergia oral e elevados níveis de Ig (imunoglobulina) E para alimentos e aeroalérgenos (SHERRILL; ROTHENBERG, 2011; LUCENDO et al., 2017).

A EoE, desde as observações feitas por Kelly e colaboradores (1995), com relação a remissão de sintomas e do infiltrado eosinofílico com uso de fórmulas de aminoácidos, é considerada consensualmente uma forma de AA (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a). Pacientes com EoE podem apresentar anafilaxia com alimentos e evoluem com melhora clínica quando tratados com dieta de restrição a determinadas proteínas alimentares (KAGALWALLA et al., 2006; CHEHADE; ACEVES, 2010).

A observação de variação sazonal com aumento de casos da EoE em períodos de polinização, observada inicialmente por Fogg e colaboradores em 2003 e novamente por Wolf, Jerath e Dallon em 2013, assinala a importância do papel dos aeroalérgenos, com aumento da eosinofilia esofágica após exposição em modelos humanos e animais (FOGG, 2003; WOLF; JERATH; DELLON, 2013; MISHRA, 2001).

Fatores ambientais, segundo estudo de caso controle em 31 pacientes com EoE e 19 com DRGE, foram avaliados com relação a tipo de parto e exposição a antimicrobianos e, apesar de não considerarem a DRGE como um grupo de controle ótimo, observaram aumento na razão de chances de EoE quando o parto foi cesáreo e diante de precoce exposição a antibióticos na infância (JENSEN et al., 2013). Dallon e colaboradores (2011), observaram associação inversa da eosinofilia esofágica com gastrite por *Helicobacter pylori* (DELLON et al., 2011).

Jensen e colaboradores (2018), em estudo de caso controle com 248 crianças, avaliando variáveis na vida precoce desses pacientes, observaram associação positiva da EoE com relato de febre materna durante a gestação, prematuridade, parto cesáreo, exposição a antibióticos e supressão ácida. A exposição a um animal de estimação no primeiro ano de vida apresentou associação inversa (OR: 0,58 IC: 95% 0,34-0,97) (JENSEN et al., 2018).

A associação da EoE com outras desordens como doença inflamatória intestinal, síndromes hipereosinofílicas, desordens do tecido conectivo e atresia de esôfago tem sido observada, sugerindo a conexão de fatores genéticos para a coexistência dessas condições patológicas em um mesmo indivíduo (LUCENDO et al., 2017; ABONIA et al., 2013; KASSABIAN et al., 2014; JOHNSSON et al., 2011).

## 2.4 Patogenia

A resposta imunológica e inflamatória na EoE ainda não está completamente esclarecida. A interação entre fatores genéticos e ambientais tem sido estudada e o papel do microbioma e da barreira epitelial, além do EOS, tem ganhado destaque na discussão da patogenia dessa doença (CALDWELL; PAUL; ROTHENBERG, 2017; DAVIS, 2018).

Dados sobre a presença de fatores ambientais associados com locais de risco genético nos *locus* 5q22 e *locus* 2p23 são relatados em recente publicação. O primeiro é codificador do gene TSLP, o qual induz o desenvolvimento de células Th2 e ativa EOS e basófilos e o segundo, do gene CAPNI 14, o qual é uma enzima proteolítica específica do esôfago, induzida pela IL (interleucina) -13 e envolvida na homeostase e reparo epitelial (O'SHEA et al., 2018).

Estudo realizado em crianças por DeBrosse et al. (2006), observou que em condições habituais, o trato digestório de indivíduos saudáveis, exceto o esôfago, é território para a presença habitual dessas células (DEBROSSE et al., 2006).

Os EOS representam 6% das células nucleadas da medula e, apesar de serem a segunda subpopulação menos presente no conteúdo de sangue periférico, são importantes em doenças inflamatórias locais e sistêmicas, com papel reconhecido no controle de enfermidades causadas por parasitas, vírus e bactérias e auxiliam a modulação da resposta imune e alérgica em muitos órgãos (RAMIREZ et al., 2018; RADONJIC-HOSLI; SIMON, 2014.)

Os EOS exercem ainda funções como célula para apresentação de抗ígenos, responsáveis por expressar as moléculas do complexo de histocompatibilidade e secretar as IL 2, 4, 6, 10, 12, as quais são capazes de ativar as células T (DAVIS; ROTHENBERG, 2013). É um elemento potencial para produzir elementos como as IL 1, 3, 4, 5 e 13, fator de crescimento tumoral beta (TGF- beta), fator de necrose tumoral alfa (TNF- alfa), proteína inflamatória de macrófagos (1 MPF-1) e a eotaxina-3, com múltiplas implicações no processo inflamatório e na resposta imunológica do indivíduo (ABONIA; ROTHENBERG, 2012).

A importância do EOS no desenvolvimento da doença com efeitos diretos no dano tecidual, após sua degranulação e liberação de proteínas citotóxicas ao tecido esofágico, como a proteína básica principal, a peroxidase eosinofílica e a proteína catiônica eosinofílica, já foi reportada por vários autores (ABONIA; ROTHENBERG, 2012; DAVIS, 2018).

A presença do EOS é o elemento-chave conceitualmente aceito para diagnóstico e marcador de atividade inflamatória na EoE. Contudo, autores observaram, em modelos animais geneticamente modificados, que a ausência dessas células promoveu remissão, mas

não completa, dos achados da doença, sugerindo uma doença EoE-like que não necessariamente dependa completamente do EOS (LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a; RUBINSTEIN et al., 2011; MAVI et al., 2012).

Além dos EOS, a participação das citocinas na patogenia da EoE é fundamental, mas de forma particular, a IL-5 pelo seu papel na formação da célula (eosinofilopoiense), auxílio para sua chegada à mucosa esofágica e por participar da remodelação do tecido. Apesar de sua importância, tentativas de tratamento da EoE com anticorpos anti-IL5 não apresentaram resultados considerados satisfatórios (O'SHEA et al., 2018; STEIN et al., 2006).

Outra citocina relevante é a eotaxina -3, cujos níveis são relacionados à quimiotaxia e número de EOS. Trabalho experimental de Blanchard e colaboradores (2006), com modelo animal, identificou a eotaxina-3 como gene expressivo na EoE, ao passo que animais eotaxina-3 negativos mostraram ser incapazes de expressar eosinofilia tecidual no esôfago (BLANCHARD et al., 2006).

A participação de outras células, como mastócitos, basófilos e células dentríticas, também tem sido descrita como associada ao desenvolvimento do processo inflamatório na EoE (DAVIS, 2018).

Os mastócitos, habitualmente presentes na mucosa e submucosa do esôfago, podem contribuir com resposta de hipersensibilidade e produção local de Ig E. Em um estudo *in vitro*, essas células foram consideradas importantes para a contratilidade da musculatura lisa e para a atividade da inervação vagal na região estudada (ABONIA et al., 2010; ACEVES et al., 2010).

Trabalhos recentes têm associado a EoE com a IgG, como observado em estudo de caso controle de Rosenberg e outros autores (2018), no qual foi observado aumento dos níveis de IgG4 em tecido de biópsia esofágica de pacientes pediátricos com EoE em relação a controles. Os níveis da IgG4 estiveram relacionados ao aumento da eosinofilia e níveis elevados das IL 4, 10 e 13, sugerindo que a IgG, provavelmente de produção local, estaria relacionada à imunidade tipo 2 e na participação da produção de citocinas regulatórias (ROSENBERG, 2018).

Além da participação celular no processo inflamatório da doença, alguns autores recentemente têm observado a crescente importância da barreira epitelial e de suas proteínas reguladoras na patogênese da EoE (SCHLEIMER; BERDNIKOVS, 2017; ROCHMAN; AZOUZ; ROTHEMBERG, 2018).

O esôfago é composto por epitélio escamoso estratificado, semelhante ao da pele, porém na ausência da camada córnea está presente uma camada mucosa, com estrutura

comprometida pelo processo inflamatório. Na EoE pode ocorrer hiperplasia da camada basal, espongiosa com espaços intercelulares dilatados e alterações de suas junções, além de celularidade aumentada com predomínio de EOS. Muitos desses achados são considerados inespecíficos (DENARDI; RIDELLI, 2012).

Segundo Blevins e outros autores (2018), a barreira epitelial esofágica apresenta três níveis de defesas: pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial. A água, a saliva deglutida, o bicarbonato e o muco formam uma tênue barreira na camada pré-epitelial. A camada epitelial apresenta um estrato córneo, e é formada com participação de uma proteína chamada filagrina (FLG), responsável por condensar o citoesqueleto celular e gerar escamas protetivas (BLEVINS et al., 2018).

Estruturalmente, o que os autores consideram mais importante para a integridade da barreira é a junção intercelular, a qual é composta de um complexo de junção estreita ou apertada, junções aderentes e os desmossomos. O complexo de junções estreitas é formado por inúmeras proteínas, como a claudina, a ocludina, a zonulina e moléculas de adesão juncional, as quais conectam as células, permitindo o transporte de íons e auxiliando na arquitetura do epitélio (CHEN et al., 1997; BLEVINS et al., 2018).

Furuse e colaboradores (2002) observaram o papel crucial das claudinas na integridade epitelial em estudo experimental com camundongos deficientes de claudina -1. Em período inferior a 24 horas, os animais morreram, por perda de líquido transepidérmico, mesmo que a estrutura estratificada do epitélio estivesse mantida com os queratinócitos (FURUSE et al., 2002).

Outras proteínas envolvidas na integridade da barreira epitelial são as proteínas E-caderina, caderina, zônula de oclusão e ocludina, responsáveis pela estabilização da estrutura e sinalização entre as células, polaridade celular, manutenção da morfologia tecidual, movimento ciliar, transporte de vesículas, proliferação e diferenciação celular (LIU et al., 2000; HARTSOCK; NELSON, 2008; LECKBAND; PRAKASAM, 2006; POKUTA; WEIS, 2007; GRUNWALD, 1993).

Além do papel imprescindível das proteínas na integridade da barreira epitelial esofágica, Hollwarth e colaboradores (1986), em modelo experimental com animais, demonstraram a importância da vascularização adequada, a qual permite fluxo sanguíneo e promove trocas teciduais, como mecanismos de proteção desse epitélio (HOLLWARTH et al., 1986).

Os defeitos de barreira podem ser induzidos por agressões ambientais, incluindo proteases, lesões químicas ou traumas e por perda da função de proteínas-chaves, as quais

sendo responsáveis pelas junções epiteliais, respondem pela arquitetura do epitélio, pelo controle de permeabilidade celular e proteção à sensibilização (ABDULNOUR-NAKHOUL et al., 2013).

A manutenção da integridade e funcionalidade da barreira epitelial do esôfago é um processo complexo e dependente de inúmeros fatores. A migração celular ocorre de minutos a horas e a replicação, pela dependência de mitose e síntese proteica, geralmente é morosa. Quando ocorre a perda no equilíbrio protetivo, pode ocorrer dano à mucosa e um processo inflamatório, como visto na EoE (DAVIS, 2018; BLEVINS et al., 2018).

Na EoE, o comprometimento de proteínas de barreira foi evidenciado por Katsza e colaboradores (2014), os quais avaliaram pacientes com EoE em atividade, EoE tratados e pacientes com DRGE, quanto ao grau de espaçamento celular observado na análise microscópica do esôfago, e na expressão das proteínas juncionais estudadas por imuno-histoquímica. Esses autores verificaram fraca expressão proteica das proteínas FLG, zona de oclusão e ocludina, associada à espongiosa no grupo com doença em atividade e não tratados (KATZKA et al., 2014).

Avanços considerados promissores na investigação da atividade da EoE foram realizados por alguns autores. A avaliação da estrutura epitelial, através de pesquisa de anticorpos séricos (anti-NC16A IgG4 e anti -DSG3 IgG4) contra desmossomas e hemidesmossomas, organelas de adesão presentes em queratinócitos, foi realizada por Dellon e colaboradores (2018) com 24 pacientes com EoE. Observou-se nesse estudo, associação destes anticorpos com a EoE ativa, com queda dos mesmos após tratamento com corticosteroides, sugerindo a possibilidade de novos marcadores para avaliação de danos da barreira epitelial e atividade de doença, que não somente o número de EOS encontrados na biópsia esofágica (DELLON et al., 2018b).

A atividade inflamatória multifatorial e persistente pode levar ao remodelamento tecidual, com participação das IL 4 e 13, produzidas em abundância em distúrbios alérgicos e com efeito pró-fibrótico (BLANCHARD et al., 2011).

Aceves (2011) considera evolução semelhante à asma, na qual抗ígenos promovem inflamação e lesão epitelial, produção de citocinas, remodelamento e fibrose e, em alguns fenótipos, mesmo independente da inflamação, o resultado final seria a perda da funcionalidade do órgão (ACEVES, 2011).

O entendimento da patogenia da EoE é fundamental para compreender a natureza complexa e multifatorial dessa doença, a qual envolve predisposição genética, alérgenos

(alimentares e inalantes), a microbiota do indivíduo, e a integridade das proteínas da barreira epitelial, todos, partícipes no processo inflamatório e na evolução dessa doença.

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da EoE é clínico-patológico, com quadro de disfunção esofágica associado a achados endoscópicos e histológicos (LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

### 2.5.1 Aspectos clínicos

Alguns autores consideram a EoE, a mesma doença em adultos e crianças, mas com relação à sintomatologia apresentada há diferenças (STRAUMANN et al., 2012; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

Crianças mais velhas e adultos apresentam mais frequentemente disfagia ou dificuldade de deglutição, impacção, particularmente com alimentos sólidos e, em algumas situações dor torácica não cardiológica. Esse sintomas, podem estar associados ao progresso da doença e remodelamento tecidual (LUCENDO et al., 2017; ACEVES, 2011). Kahn e colaboradores (2015) publicaram uma série de casos de pacientes adultos com diagnóstico de EoE, com dor torácica induzida pelo exercício, sendo dois deles somente com essa manifestação clínica (KAHN et al., 2015).

Okimoto e colaboradores (2018), em um estudo prospectivo no qual avaliou 100 pacientes adultos os quais, apresentavam sintomas da DRGE, e eram refratários ao tratamento. Esse estudo utilizou a técnica de imuno-histoquímica para avaliar junções epiteliais e encontrou 9,7% de prevalência de EoE, independente do achado endoscópico, sinalizando que sintomas de regurgitação e epigastralgia relatados na DRGE podem ser observados na EoE (OKIMOTO et al., 2018).

Crianças menores apresentam habitualmente sintomas sugestivos da DRGE como vômitos, náuseas, engasgos, dor abdominal, recusa alimentar e falência no ganho de peso (LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

Liacouras e outros autores (2005), inicialmente avaliando 381 crianças com diagnóstico de EoE, observaram sintomatologia de DRGE em 312 delas (81,2%). Posteriormente o mesmo autor e seus colaboradores observaram que 5 a 10% dos pacientes pediátricos não respondedores ao tratamento da DRGE apresentavam EoE (LIACOURAS et

al., 2014).

Sintomas não relacionados ao trato digestório já haviam sido relatados por Orestein e colaboradores (2000), os quais avaliaram 30 pacientes (crianças e jovens) e observaram presença de sintomas respiratórios em 60% deles, dos quais, 24% eram asmáticos, questionando a possibilidade da sintomatologia observada, ser parte do perfil atópico desses pacientes (ORESTEIN et al., 2000).

Outro estudo em crianças observou que 21,9% daquelas com EoE foram acompanhadas por médicos otorrinolaringologistas, e apresentavam disfunção da tuba auditiva (27,5%), distúrbios respiratórios do sono (24,9%), disfagia (12%), rinosinusite e congestão nasal (9,3%), além de estridor de vias áreas (5,2%) (OTTESON et al., 2012). Estudo de revisão recente, realizado por Rubinstein e Rose (2018), cita publicações com diferentes metodologias que encontram diagnóstico de EoE em pacientes com sintomas otorrinolaringológicos e respiratórios, variando de 3,7 a 10% (RUBINSTEIN; ROSE, 2018).

Uma escala para avaliação de sintomas digestivos, publicada inicialmente na língua inglesa e posteriormente com tradução adaptada para língua portuguesa, foi sugerida como instrumento para quantificação objetiva dos sintomas percebidos pelos pais e pelas crianças com EoE no intuito de auxiliar o diagnóstico nesses pacientes (FRANCIOSI et al., 2011; SANTOS et al., 2018).

A sintomatologia pode ser inespecífica e marcada pela pluralidade de manifestações, inclusive extradigestivas, não sendo aceito consensualmente, que os sintomas, quando isolados, seriam suficientes para o diagnóstico da EoE (LUCENDO et al., 2017; DELLO N et al., 2018a).

### 2.5.2 Aspectos endoscópicos

Para diagnóstico de EoE, torna-se necessário e imprescindível um exame de EDA com realização de biópsias do esôfago e de outros segmentos do trato digestório (LUCENDO et al., 2017).

Inúmeras publicações sobre os achados endoscópicos têm sido realizadas, desde os primeiros relatos por Straumann e colaboradores (1994), que observaram em 10 pacientes disfágicos uma secreção esofágica branca semelhante à infecção fúngica (STRAUMANN et al., 1994). O estabelecimento de uma escala de referência endoscópica (EREF), a qual possilite gerar um valor objetivo que auxilie a acurácia do diagnóstico foi realizado, mas ainda aguarda validação para a população pediátrica (HIRANO et al., 2013).

Os achados endoscópicos habitualmente observados e relatados são edema com apagamento dos vasos da mucosa esofágica, conferindo aspecto de palidez à mesma, estrias ou linhas verticais e longitudinais ao órgão, exsudato com placas brancacentas aderidas à mucosa e anéis que podem ser transitórios ou fixos, à semelhança de uma traqueia, gerando desde aparência circular na avaliação da mucosa esofágica a situações que não permitem a progressão do aparelho de EDA (HIRANO et al., 2013).

Apesar de serem vários os achados endoscópicos na EoE, nenhum é considerado patognomônico, pois podem ser encontrados em outras desordens esofágicas (LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011). A mucosa aparentemente normal no exame endoscópico pode ser encontrada em pacientes com EoE, o que torna a biópsia imprescindível (CROESSE et al., 2003).

Kim e outros autores (2012), posteriormente em um estudo de meta-análise com 4678 pacientes e 2742 controles, em uma centena de artigos avaliados, observaram que pacientes com EDA normal apresentaram EoE em 17% dos casos nos estudos, os quais foram realizados retrospectivamente e em 7% deles, quando a metodologia utilizada era a análise prospectiva (KIM et al., 2012).

A EDA, realizada nos pacientes com EoE, ainda pode ser útil na avaliação dos possíveis fenótipos da doença (estenótico ou inflamatório) e para realizar as biópsias esofágicas, critério-chave para o diagnóstico (SINGLA et al., 2015; DELLON et al., 2018a).

### 2.5.3 Aspectos histopatológicos

A avaliação histológica é fundamental para o diagnóstico de EoE, e as recomendações atuais são para coleta de pelo menos seis fragmentos em localizações distintas na mucosa esofágica, habitualmente distal e proximal, particularmente pelo acometimento tecidual não ser contínuo (LIACOURAS et al., 2011; DELLON et al., 2018a). Dellon e colaboradores (2012) observaram variação na avaliação histológica em um mesmo paciente dependendo da localização da amostra tecidual obtida, o que sinaliza a necessidade de um número maior de fragmentos de biópsia para aumentar a acurácia do exame (DELLON; SPECK; WOODWARD, 2012).

A contagem das células de EOS é o critério maior consensualmente estabelecido para o diagnóstico da EoE, desde o primeiro consenso realizado sobre essa doença, e a densidade mínima estabelecida é de 15 EOS/CGA (FURUTA et al., 2007; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

Anteriormente ao reconhecimento da EoE como entidade clínica e histopatológica, a presença de EOS na avaliação tecidual era atribuída a DRGE, sendo interessante a percepção que estas duas entidades podem coexistir (LUCENDO et al., 2017). Em uma avaliação de amostras de biópsias de pacientes com EoE e DRGE, Mueller e outros autores (2008), analisando a densidade eosinofílica e a expressão de proteínas resultantes da degranulação dos EOS, concluíram que o diagnóstico histopatológico poderia se basear na densidade dessas células (MUELLER et al., 2008).

Outros achados histológicos são considerados importantes marcadores de dano epitelial e processo inflamatório. A presença de microabcessos ou acúmulo de EOS, a hiperplasia da camada basal, o alongamento das papilas (extensões digitiformes da lâmina própria), o aumento do espaço entre as células ou espongiose e a fibrose da lâmina própria são observados na avaliação microscópica desses pacientes (LUCENDO et al., 2017).

A hiperplasia de células da camada basal não é um achado exclusivo da EoE, podendo ser encontrada em outras doenças que acometem o esôfago como a DRGE. Na EoE é um achado mais expressivo e pode ser um sinal do remodelamento tecidual (STEINER; KERNEK; FITZGERALD, 2006; ACEVES, 2014).

Outra descoberta importante que sinaliza o comprometimento da barreira epitelial é a espongiose, que consiste na dilatação ou aumento dos espaços entre as células, sendo uma característica do processo inflamatório. A espongiose pode levar a aumento da permeabilidade, o que facilitaria a penetração de抗ígenos, considerado evento precoce na patogênese da doença (DAVIS, 2018).

Alguns autores, avaliando por impedância de fluxo a mucosa de pacientes com EoE, observaram correlação positiva entre o aumento do fluxo e o aumento dos espaços intercelulares e a contagem de EOS, sinalizando acometimento de barreira epitelial (KATZKA et al., 2015).

Atualmente para adequada avaliação histológica desses pacientes, considera-se a pluralidade dos achados relatados, e alguns trabalhos já observam a importância da análise em nível molecular, com o estudo pormenorizado da alteração na expressão das proteínas, as quais são componentes do epitélio esofágico. Essas alterações sinalizariam o comprometimento de barreira epitelial e a atividade inflamatória da doença (DAVIS, 2018; BLEVINS et al., 2018).

## 2.6 Tratamento

### 2.6.1 Tratamento Farmacológico

#### 2.6.1.1 Inibidor de bomba de prótons (IBP)

Inicialmente o IBP era utilizado como critério diagnóstico, auxiliando a diferenciação entre a EoE e a DRGE. Evolutivamente, no período compreendido entre 2011 e 2013, foi considerado critério para diferenciar a EoE da eosinofilia esofágica responsiva a IBP, com posterior percepção de que se tratava da mesma doença (LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2013; DELLON et al., 2018a).

Alguns autores, avaliando 326 pacientes em um período de sete anos com presença de eosinofilia em densidade superior a 15 EOS/CGA, observaram melhora histológica em torno de 40% com a utilização de IBP (DRANOVA et al., 2009). Uma avaliação prospectiva em adultos, observou remissão da doença em 50%, e trabalhos com análise do transcriptoma, revelaram um grupo geneticamente propenso a responder a essa medicação (MOLINA-INFANTE et al., 2016; SHODA et al., 2017).

Um estudo de meta-análise, avaliando a eficácia do IBP na remissão de sintomas e da eosinofilia histológica, compilando 33 estudos e 619 pacientes, independente do tipo de IBP utilizado, observou melhora da sintomatologia em 60,8% dos casos e histológica em 50,5% dos pacientes analisados. A orientação atual para os pacientes pediátricos é uma dose de 1-2mg/Kg/dia, preferencialmente administrada em duas vezes ao dia (LUCENDO; MOLINA-INFANTE, 2016; MOLINA-INFANTE; LUCENDO, 2017).

Atualmente a EoE e a DRGE não são considerados patologias independentes, podendo coexistir simultaneamente em um mesmo paciente. Os IBPs não seriam utilizados para diferenciar essas doenças, mas poderiam ser uma estratégia no tratamento da EoE, por regular negativamente a resposta Th2 e bloquear a expressão da eotaxina-3 atuando como droga anti-inflamatória, além de diminuir a exposição ácida deletéria à mucosa observada na DRGE (MOLINA-INFANTE et al., 2016; LUCENDO et al., 2017).

A recrudescência dos sintomas e das alterações histológicas são observadas com a retirada da medicação, e estratégias terapêuticas em longo prazo ainda necessitam ser definidas (LUCENDO et al., 2017). Estudo prospectivo realizado em período observacional de 12 meses encontrou manutenção de remissão clínica e controle das alterações teciduais em tratamento de manutenção com doses mais baixas (GUTIERREZ-JUNQUEIRA et al., 2016).

### 2.6.1.2 Corticosteroides

Os corticoides sistêmicos são efetivos, mas pela possibilidade de efeitos colaterais observados nos pacientes que utilizam essas medicações em longo prazo, são reservados para casos mais severos (LUCENDO et al., 2017).

A utilização de corticosteroides, particularmente as apresentações para uso inalados, mas deglutidos, para o tratamento da EoE, tem sido estabelecida desde os primeiros consensos. Essa medicação é considerada no manejo da doença, para indução da remissão histológica e dos sintomas em pacientes adultos e pediátricos. As opções são a fluticasona e a budesonida na forma viscosa, com doses respectivamente de 880-1760mcg/dia e 1-2mg/dia (FURUTA et al., 2007; DELLON et al., 2018a).

Um estudo prospectivo, duplo cego, placebo controlado em pacientes adultos com EoE, comparando a eficiência da fluticasona inalada deglutida com o IBP, observou respostas similares entre os dois grupos na remissão histológica, com resposta clínica superior ao IBP no grupo com DRGE associado (MOAWAD et al., 2013a). Trabalho de revisão sistemática e meta-análise com ensaios clínicos controlados com placebo, com 174 pacientes de cinco estudos, observou remissão histológica completa significativa (OR:20,81) no grupo com corticoide deglutido em relação ao placebo, mas sem impacto similar na sintomatologia (MURALI et al., 2016).

Outro estudo prospectivo com 54 crianças em uso de fluticasona deglutida por 20,4 meses mostrou melhora clínica e histológica em 83% dos pacientes assistidos, porém observou no segundo ano de acompanhamento e em tratamento uma queda para 59%, mesmo quando esses pacientes permaneciam assintomáticos. Três casos de fungemia foram relatados, e nenhum impacto no crescimento foi observado nesse grupo (ANDREAE et al., 2016).

A EoE é uma doença de natureza crônica, sendo necessária a utilização de medicações em longo prazo. Estudos prospectivos e observacionais mostraram eficácia no tratamento e bom perfil de segurança para o uso dessas medicações em tempo prolongado (GREUTER et al., 2018).

### 2.6.1.3 Outras medicações

O uso do cromoglicato de sódio e anti-histamínicos não mostrou melhora clínica ou histológica. O antagonista do receptor de leucotrienos (montelukast), não foi superior aos

corticosteroides na manutenção da remissão histológica (SCHOEPFER; STRAUMANN, 2018).

Um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado em 26 pacientes adultos refratários ou dependentes do tratamento com corticoides, foi realizado para avaliar a eficácia do antagonista do receptor da prostaglandina (OC000459), apresentando significativa redução da eosinofilia esofágica e melhora da sintomatologia (STRAUMANN et al., 2013).

Drogas biológicas têm sido estudadas por diversos autores. Anticorpos anti-IL 5 (mepolizumab e reslizumab), anti-IL 13 (QAX576) e anticorpo anti-IgE (omalizumab) mostraram melhora da infiltração eosinofílica sem remissão completa e não apresentaram impacto positivo significativo na melhora dos sintomas. Anti TNF-alfa foi avaliado em um número pequeno de pacientes, sem melhora de sintomas e achados histológicos (SCHOEPFER; STRAUMANN, 2018).

O bloqueador do receptor de angiotensina II (Losartan), medicação anti-hipertensiva que reduz o TGF-beta, atualmente em estudo de fase II, tem sido descrito como possibilidade de terapia para os pacientes com EoE (PESEK; GUPTA, 2018).

#### 2.6.1.4 Tratamento dietético

As primeiras observações sobre o potencial do manejo dietético para tratamento da EoE foram avaliadas em trabalho realizado por Kelly e colaboradores (1995). Esses autores acompanharam dez crianças com DRGE refratária ao tratamento clínico e cirúrgico, com infiltrado eosinofílico percebido na análise histológica, as quais evoluíram com melhora em todos os parâmetros avaliados após receberam fórmula de aminoácidos (KELLY et al., 1995).

Após o reconhecimento da EoE como entidade clínica patológica, os consensos observam que o tratamento dietético é efetivo no manejo desses pacientes, com taxas de remissão em uso de fórmulas de aminoácidos em torno de 90%, sendo inegável a relação dessa doença com sensibilidade e alergia a proteínas alimentares (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011; LUCENDO et al., 2017; DELLON et al., 2018a).

A desvantagem observada é a pobre adesão à sua utilização pelo sabor impalatável, necessidade de vias alternativas (sonda nasogástrica) para utilizá-las, custo e a percepção do retorno da sintomatologia e do processo inflamatório esofágico com a interrupção do seu uso (PETERSON et al., 2013; LUCENDO et al., 2017).

Outra possibilidade à fórmula de aminoácidos é a dieta com retirada empírica de grandes grupos proteicos (dieta sétupla), na qual a retirada de leite, ovo, soja, trigo,

amendoim, peixe e frutos do mar alcançou melhora clínica e histológica em 74% (KAGALWALLA et al., 2006). Posteriormente, a avaliação de estudos com retirada de cinco, quatro e três grupos proteicos, alcançou melhora clínica e da infiltração eosinofílica esofágica em 74%, 50% e 40% respectivamente (LUCENDO et al., 2017).

A utilização de testes de sensibilização alergênica imediata e tardia para nortear a exclusão de grupos alimentares como tratamento para esses pacientes foi realizada por Spergel e colaboradores (2002) em 26 pacientes pediátricos. Dos pacientes avaliados, 69,2% apresentaram melhora da sintomatologia e 50%, melhora histológica. O leite e o ovo foram os alimentos creditados como mais alergênicos (SPERGEL et al., 2002). Pela falta de padronização na realização dos testes e sua baixa acurácia, atualmente não são rotineiramente utilizados (LUCENDO et al., 2017).

Em trabalho realizado no Brasil, com utilização de testes de sensibilidade em 35 pacientes pediátricos com EoE, foi observado sensibilização para alimentos em 45,7% dos pacientes avaliados, sendo o leite de vaca o mais frequente. Foi expressiva a sensibilização desses pacientes para inalantes (REZENDE et al., 2014).

A dieta de exclusão é uma alternativa para o tratamento da EoE, e uma equipe interdisciplinar para assistência ao paciente é imprescindível. Segundo alguns autores, a retirada das proteínas da alimentação do paciente poderia evitar o remodelamento tecidual nessa doença (LUCENDO et al; 2017). Fatores estressores em crianças e familiares relacionados ao preparo do alimento, risco de exposição a alérgenos e custos estão atualmente sendo estudados (CASE et al., 2017).

#### 2.6.1.5 Dilatação por endoscopia

O procedimento endoscópico é fundamental para diagnóstico, mas pode ser utilizado para tratamento na EoE. Dilatações em pacientes que apresentaram estenoses esofágicas mostraram ser efetivas. Estudo de meta-análise realizado por Moawad e colaboradores (2013b), avaliando eficácia e segurança desse procedimento em 860 pacientes submetidos a 992 dilatações, observou três casos de perfuração e uma hemorragia, perfazendo um risco de complicações menor que 1% (MOAWAD et al., 2013b). Outros autores apresentaram resultados semelhantes em recente publicação avaliando 1000 pacientes adultos e crianças com EoE, os quais apresentaram baixas taxas de complicações pós-dilatação e, felizmente, nenhum óbito. Foi frequente o relato de dor torácica pós-procedimento (RICHTER, 2018).

## **2.7. Complicações e prognóstico**

A consequência mais severa é a formação de fibrose com estenose da luz esofágica, dismotilidade e disfagia (LIACOURAS; SPERGEL; GOBER, 2011). Estudos sobre remodelamento epitelial com fibrose observam, como em outras doenças atópicas, especialmente em crianças, uma “janela de oportunidade” para controle do processo inflamatório epitelial e subepitelial, na qual a instituição do tratamento adequado poderia evitar ou reverter a evolução da doença (ACEVES, 2011).

O prognóstico, apesar de não haver relato de malignização até o momento, ainda não está claro. Os sintomas e a piora histológica tendem a recorrer com interrupção do tratamento, gerando impacto na qualidade de vida desses pacientes e de seus familiares (FRANCIOSI et al., 2012; STRAUMANN et al., 2003).

## **2.8. Considerações finais**

A EoE é uma doença crônica, de diagnóstico recente e manejo complexo. A história natural, a possível reversibilidade ou a evolução com remodelamento epitelial, as consequências clínicas em longo prazo, bem como a efetividade do tratamento com seus potenciais efeitos colaterais, ainda apresentam lacunas no conhecimento médico e científico.

Atualmente, esforços para melhor entendimento da patogenia, com foco no papel do microbioma, do ambiente e do comprometimento da barreira epitelial esofágica e sua relação com a sensibilização a alimentos e inalantes, têm sido uma constante em vários países e são necessários para compreender essa doença desafiadora, mitigar as complicações futuras e melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

# **3 OBJETIVOS**

## **3.1 Geral**

Avaliar o comprometimento da barreira epitelial em fragmentos de mucosa esofágica de pacientes pediátricos e adolescentes com EoE em acompanhamento no Ambulatório de Alergia Alimentar da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

### **3.2 Específicos**

- a. Descrever os achados histopatológicos encontrados nas biópsias esofágicas de pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de EoE submetidos ao exame de EDA.
- b. Avaliar o número de EOS encontrados nas biópsias esofágicas de pacientes pediátricos e adolescentes com diagnóstico de EoE submetidos ao exame de EDA.
- c. Avaliar a expressão da E-caderina nos fragmentos das biópsias esofágicas realizadas comparadas com os controles.
- d. Avaliar a expressão da Filagrina nos fragmentos das biópsias esofágicas realizadas comparadas com os controles.
- e. Correlacionar a expressão da E-caderina e Filagrina com os achados epidemiológicos, endoscópicos e histológicos dos pacientes avaliados.

**4 ARTIGO 1. “A E-CADERINA PODE SER UM MARCADOR DE COMPROMETIMENTO DE BARREIRA EPITELIAL NA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA?”**

Tipo de manuscrito: Estudo Caso controle

**E-caderina: comprometimento de barreira e Esofagite Eosinofílica**

Rezende ERMA et al. Comprometimento de barreira e Esofagite Eosinofílica

Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende, Mariza Rodrigues de Faria, Ignez Candelori, Juliana Salomão Daud, Flávia Araújo Alves, Jair Cunha Junior, Gesmar Rodrigues da Silva Segundo

**Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende**, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

**Mariza Rodrigues de Faria**, Departamento de Endoscopia e Cirurgia Pediátrica, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

**Ignez Candelori**, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

**Juliana Salomão Daud**, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

**Flávia Araújo Alves**, Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

**Jair Cunha Junior**, Departamento de Imunologia, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

**Gesmar Rodrigues da Silva Segundo**, Departamento de Pediatria, Universidade federal de Uberlândia, Brasil

Número ORCID: Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende ( ), Mariza Rodrigues de Faria ( ), Ignez Candelori ( ), Juliana Salomão Daud ( ), Flávia Araújo Alves ( ), Jair Cunha Junior ( ), Gesmar Rodrigues da Silva Segundo ( ).

Declaração do comitê de revisão institucional:

Declaração de consentimento livre e esclarecido: todos os pacientes participantes desse trabalho apresentam declaração de consentimento livre e esclarecido

Declaração de conflito de interesse: os autores declaram não possuírem conflitos de interesse para elaboração desse manuscrito

Declaração de compartilhamento de dados:

Declaração STROBE:

Correspondência para: Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende

[ericamarianor@gmail.com](mailto:ericamarianor@gmail.com)

Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. Fone (55-34 996620079)

#### 4.1 Resumo

**Objetivo:** Analisar a expressão da E-caderina como marcador de comprometimento de barreira em pacientes pediátricos com Esofagite Eosinofílica (EoE). **Métodos:** As biópsias de 24 pacientes pediátricos e adolescentes brasileiros com diagnóstico consensualmente estabelecido de EoE foram analisadas e comparadas com 17 pacientes controle com sintomas gastrointestinais e que necessitavam de uma endoscopia digestiva alta (EDA). Dados relativos à idade, ao sexo, ao tempo de doença, à sintomatologia, aos aspectos endoscópicos e histológicos, além dos tratamentos realizados, foram obtidos de registros médicos e analisados. Imuno-histoquímica com o anticorpo mononoclonal de coelho anti E-caderina (clone EP700Y, Cell Marque, USA) foi realizada e a expressão da proteína no epitélio dos pacientes com EoE e controles foi avaliada por patologista treinado. O nível de significância realizado para todas as análises foi de  $p<0,05$ . **Resultados:** 62,5% dos pacientes com EoE eram do sexo masculino, com idade de 10,8 anos (+- 11,6 meses) e 45,8% apresentaram alergia alimentar (AA), não sendo observada em nenhum paciente do grupo controle. O número de eosinófilos encontrados no epitélio esofágico foi significativamente maior no grupo com EoE. A E-caderina foi alterada, com redução na sua expressão em 11(54,1%) dos pacientes com EoE e em 1 (5,8%) dos controles ( $p<0,05$ ). Nos pacientes com EoE não houve não houve diferença estatística ( $p<0,05$ ) com relação aos sintomas, achados endoscópicos, histológicos (exceto o número de eosinófilos), idade de início dos sintomas, tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença e ao tempo de doença até realização da imuno-histoquímica. Nos pacientes com EoE e E-caderina alterada, 8 (61,5%) estavam em tratamento com dieta de exclusão. **Conclusão:** Os pacientes com EoE desse estudo apresentaram significativa subexpressão da E-caderina na análise imuno-histoquímica em relação aos controles, sinalizando o comprometimento da barreira esofágica nessa doença.

## 4.2 Introdução

Os defeitos de barreira nas doenças alérgicas podem ser induzidos por perdas, ou defeitos em proteínas chaves das junções epiteliais, ruptura por agressões ambientais, incluindo proteases, lesões químicas ou traumas [1].

Dentre as proteínas importantes que compõem a barreira, temos a E-caderina, que é parte de uma família de glicoproteínas de membrana, expressa em todos os tipos de células epiteliais, codificada pelo gene localizado no cromossomo 16 (16q22) [2,3,4]. É composta de domínio extracelular que forma aderências homotípicas, dependentes de cálcio, auxiliando a adesão intercelular e a sinalização celular em conjunto com as proteínas cateninas citoplasmáticas. Esse complexo é importante para a polaridade celular e manutenção da morfologia tecidual e diferenciação celular normal [4,5].

O domínio citoplasmático da E-caderina é ligado às proteínas âncoras p120 catenina, b-catenina e a-catenina, que formam uma interface com o microtúbulo citoesqueleto de rede de actina, auxiliando não somente a forma, mas o movimento ciliar, o transporte de vesículas, a proliferação e diferenciação celular [6].

A E-caderina é parte das junções epiteliais intercelulares que formam um adesivo estrutural da barreira mucosa, separando o tecido subjacente do ambiente e permitindo a comunicação entre as células e o transporte iônico transcelular [2,5,6]. Em cânceres indiferenciados, a redução da expressão dessa proteína está associada a maior poder invasivo e metástase de tumores [7,8].

Atualmente a E-caderina tem sido estudada nas doenças alérgicas e parece contribuir na modulação da resposta imune. O estudo dessa proteína em pacientes com asma e rinite alérgica demonstrou uma redução na expressão dos epitélios pulmonar e nasal [9,10,11]. Outra doença atualmente emergente, associada a quadros atópicos e comprometimento nas junções epiteliais semelhantes a outras doenças Th2 é a Esofagite Eosinofílica (EoE) [1,12].

A EoE é uma doença imunomedida crônica do esôfago, caracterizada por um processo inflamatório, predominantemente por eosinófilos e sintomas de disfunção do órgão, considerada atualmente uma das principais causas de disfagia e impactação de alimentos em crianças e adultos [13,14].

Anteriormente considerada doença rara, atualmente apresenta incidência agrupada estimada em alguns estudos de 3,7 casos/100.000 habitantes e prevalência 1,22 casos/10.000 habitantes, com exponencial aumento observado em várias regiões do mundo e impacto na qualidade de vida de muitos pacientes, despertando interesse de grande parte da comunidade científica [15,16,17].

Considerando a barreira como importante aspecto na formação do processo inflamatório da EoE, esse estudo tem por objetivo analisar a expressão da E-caderina como marcador de comprometimento dessa barreira em pacientes pediátricos e adolescentes com essa doença.

#### **4.3 Material e Métodos**

##### **Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (CEP/UFU número: 37330414.3.0000.5152). Os responsáveis legais pelos participantes e os participantes adolescentes assinaram Termo de Consentimento e/ou Assentimento Livre Esclarecido.

##### **População do Estudo**

Os pacientes com EoE e outras patologias gastrointestinais, acompanhados nos Ambulatórios de Alergia Alimentar e de Gastroenterologia Infantil do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Brasil), com indicação de endoscopia digestiva alta (EDA), com idades entre 0 e 18 anos, foram convidados a participar do estudo no período de junho de 2015 a junho de 2018. Vinte e quatro pacientes com EoE e 17 pacientes com outras doenças gastrointestinais tais como gastrite e doença do refluxo gastro-esofágico foram incluídos no estudo. Os dados relativos ao sexo, idade, sintomatologia, atopia e tipos de tratamento foram coletados por meio do prontuário médico do paciente. Todos os pacientes com EoE desse estudo estavam em tratamento (medicamentoso e/ou dietético).

##### **Endoscopia digestiva alta**

Os exames endoscópicos foram realizados no setor de Endoscopia da mesma unidade, sob sedação anestésica, por dois endoscopistas pediátricos experientes, utilizando os aparelhos Olympus XP-150, XP-140 e GIF-XP 160, de acordo com o tamanho da criança. Foram coletados três fragmentos de mucosa esofágica em esôfago médio e três em esôfago inferior, estômago e duodeno para realização do anátomo-patológico. As alterações observadas na EDA foram encaminhadas para o registro médico do paciente.

### **Análise histológica**

Os fragmentos retirados durante a EDA foram conservados em formalina tamponada a 10% e incluídos em parafina, seccionados em fatias de três micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, corados pela hematoxilina e eosina e analisados em microscópio óptico (Olympus BX 41) com aumento de 400 vezes por patologista treinado para determinar: presença e quantidade de eosinófilos, presença e alongamento das papilas dérmicas, presença e intensidade de hiperplasia da camada basal, espongiosis e presença de microabscessos de eosinófilos.

### **Análise Imuno-histoquímica**

Secções dos espécimes de biópsia incluídos em parafina, com espessura aproximada de 3  $\mu\text{m}$ , foram colocadas sobre lâminas histológicas tratadas com 3-Aminopropyltriethoxsilane (SIGMA, Chemical Co., USA); desparafinizadas em xanol (2 banhos de 20 minutos cada), hidratadas em concentrações decrescentes de etanol, lavadas em água corrente (10 minutos) e submetidas a resgate antigênico pelo calor, com a utilização do tampão EDTA (0,3722 g de EDTA para 1000 ml de tampão, pH 8,03) e aquecidas em forno de Microondas, alta potência, (3 ciclos de 5 minutos). A seguir foram resfriadas por 20 minutos, lavadas em água corrente e foi bloqueada a atividade da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes (4 banhos de 3 minutos). Após lavadas em água corrente e imersas em PBS (Tampão fosfato salina) pH 7,4, foram incubadas por 18 horas a 5°C com o anticorpo monoclonal de coelho anti E-caderina (clone EP700Y, Cell Marque, USA), seguida pela incubação por 30 minutos em polímero detector com peroxidase (HiDef HRP-coelho/camundongo 954D-32, Cell Marque, USA).

A coloração foi desenvolvida por incubação com a solução reveladora substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina em PBS pH 7,4, durante 5 minutos, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris (1 a 2 minutos). As lâminas foram desidratadas

em soluções crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com lamínulas e goma de Damar. Os controles positivos foram obtidos de secções teciduais que sabidamente expressassem os抗ígenos pesquisados. Considerou-se expressão presente quando a coloração era detectada em toda a espessura do epitélio mucoso e subexpressão quando havia áreas de coloração negativa nos dois terços superiores da mucosa.

### Análise estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade da distribuição das variáveis. Para as variáveis categóricas, foram utilizados o teste de Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher, quando a frequência foi menor que cinco. Para análise da mediana da idade, foi utilizado o teste de t de Student não pareado para determinar diferença estatística entre o grupo que apresenta EoE e o grupo controle. Para as variáveis numéricas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância para todas as análises foi de  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando os programas GraphPadPrism 7.0a (La Jolla, California, USA) e SPSS Statistics 24 (Armonk, NY, USA).

### 4.4 Resultados

A tabela 1 demonstra os dados sócio demográficos dos pacientes com EoE e os controles, além da presença ou não de expressão da E-caderina. Não foi observada diferença estatística na idade e no sexo dos pacientes estudados. A presença de AA foi significativamente mais elevada nos pacientes com EoE em relação aos controles, mas não houve diferenças para as demais doenças atópicas (asma, rinite alérgica e dermatite atópica). Como esperado, só houve o encontro de eosinófilos no grupo com EoE. A E-caderina esteve significativamente alterada nos pacientes com EoE em relação aos pacientes controle.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos, número de eosinófilos e expressão da E-caderina nos pacientes com EoE e controles

	EoE n=24	Não EoE n=17	<i>p</i>
Idade (anos) <sup>a</sup> média ± DP	$10,8 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$	0,1166
Gênero <sup>b</sup>			

Masculino (%)	15 (62,5%)	10 (58,8%)	0,2159
Asma <sup>b</sup> (%)	9 (37,5%)	2 (11,7%)	0,0855
Rinite <sup>b</sup> (%)	13 (54,1%)	14 (82,3%)	0,3211
Dermatite Atópica <sup>b</sup> (%)	5 (20,8%)	0 (0,0%)	0,0650
Alergia Alimentar <sup>b</sup> (%)	11 (45,8%)	0 (0,0%)	0,0009 *
Número de eosinófilos <sup>c</sup>	41,5 (33,0-70,3)	0 (0,1-1,7)	<0,0001 *
mediana (IC)			
E-caderina alterada <sup>b</sup> (%)	13 (54,1%)	1 (5,8%)	0,0020 *

a- Teste t, b- Teste Exato de Fisher, c- Mann-Whitney, \*  $p<0,05$ , DP- desvio padrão, IC- intervalo de confiança

### Dados epidemiológicos de sintomas, achados endoscópicos e histológicos

Analizando apenas os pacientes com EoE, 11 (45,8%) apresentaram coloração compatível com E-caderina de distribuição normal, enquanto 13 (54,2%) demonstraram diminuição da coloração indicando redução na expressão dessa proteína. Não houve, diferença estatística entre esses grupos de pacientes com EoE com relação à presença ou ao tipo de sintoma apresentado, como observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Expressão da E-caderina e sintomas observados nos pacientes com EoE

	E-caderina normal n=11	E-caderina alterada n=13	p
Sintomáticos (%)	5 (45,4%)	10 (76,9%)	0,2060
Assintomáticos (%)	6 (54,5%)	3 (23,0%)	
Disfagia (%)	1 (9,0%)	5 (38,4%)	0,1660
Vômitos (%)	0 (0,0%)	2 (15,3%)	0,4819
Dor abdominal (%)	1 (9,0%)	3 (23,0%)	0,5963
Impactação (%)	3 (27,2%)	0 (0,0%)	0,0815

Teste exato de Fisher ( $p<0,05$ )

Os achados endoscópicos entre os grupos EoE e controle apresentaram diferenças em praticamente todos os parâmetros analisados (dados não demonstrados). A análise dos pacientes com EoE que possuíam E-caderina normal e E-caderina alterada também não demonstraram alteração significativa, conforme dados da tabela 3.

Tabela 3 – Expressão da E-caderina e achados endoscópicos nos pacientes com EoE

Achados endoscópicos	E-caderina normal n=11	E-caderina alterada n=13	p
Opalecência <sup>a</sup> (%)	5 (45,4%)	5 (38,4%)	0,7292
Sereção brancacenta <sup>b</sup> (%)	4 (36,3%)	10 (76,9%)	0,0953
Linhas verticais <sup>b</sup> (%)	9 (81,8%)	8 (61,5%)	0,2761
Espessamento <sup>b</sup> (%)	4 (36,3%)	2 (15,3%)	0,9017
Anéis <sup>b</sup> (%)	1 (9,0%)	1 (7,6%)	0,2370

a-Teste Qui-quadrado, b-Teste exato de Fisher, ( $p<0,05$ )

As alterações histológicas observadas nos pacientes dos grupos EoE com E-caderina normal e E-caderina alterada, para a média de eosinófilos, achados de alongamento das papilas, hiperplasia das células da camada basal e aumento do espaçamento intercelular, são demonstradas na tabela 4.

Tabela 4 – Expressão da E-caderina e achados histológicos nos pacientes com EoE

Achados histológicos	E-caderina normal n=11	E-caderina alterada n=13	p
Número de eosinófilos <sup>a</sup>	28 (1-52)	73 (22-100)	0,0179*
médiana (IC)			
Alongamento de papilas <sup>b</sup> (%)	2 (18,1%)	6 (46,1%)	0,0608
Hiperplasia de células da camada basal <sup>b</sup> (%)	6 (54,5%)	12 (92,3%)	0,0608
Espongiose <sup>b</sup> (%)	8 (72,7%)	13 (100%)	0,0815
Microabcessos eosinofílicos <sup>b</sup> (%)	2 (18,1%)	6 (46,1%)	0,2108

a- Men Withney b-Teste Exato de Fisher, \*  $p<0,05$ , IC (intervalo de confiança)

A tabela 5 mostra a expressão da E-caderina nos pacientes com EoE de acordo com o tratamento realizado. Nota-se uma diferença estatística na subexpressão da proteína nos pacientes em tratamento dietético, não sendo observada diferença com relação às outras modalidades de tratamento.

Tabela 5 – Expressão da E-caderina nos pacientes com EoE de acordo com o tratamento realizado

Tratamento realizado	E-caderina normal n=11 (%)	E-caderina alterada n=13 (%)	p
Dieta de exclusão	1 (9,0%)	8 (72,7%)	0,0131*
IBP	8 (61,5%)	7 (53,8%)	0,4225
Corticosteróide	6 (46,1%)	11 (84,6%)	0,1819

Teste exato de Fisher, (\* $p<0,05$ )

Não houve diferença estatística na alteração da expressão da E-caderina nos pacientes com EoE com relação à idade de início dos sintomas, ao tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença e ao tempo de doença até realização da imuno-histoquímica, conforme observado na tabela 6.

Tabela 6 - Expressão da E-caderina em pacientes com EoE em relação à idade de início de sintomas, tempo de diagnóstico e tempo de doença

Tempo (meses)	E-caderina normal n=11	E-caderina alterada n=13	p
	mediana ± (IC)	mediana ± (IC)	
Inicio de sintomas	59 (29,0-74,0)	48 (32,0-88,4)	0,6798
Tempo de diagnóstico	12 (6,5-15,2)	12 (8,1-22,3)	0,4921
Tempo de doença	10 (43,2-105)	5 (45,6-116,8)	0,9206

Mann-Whitney ( $p<0,05$ ), IC- intervalo de confiança

Foto 1 – (E-caderina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando grandes áreas de expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em pacientes com EoE.

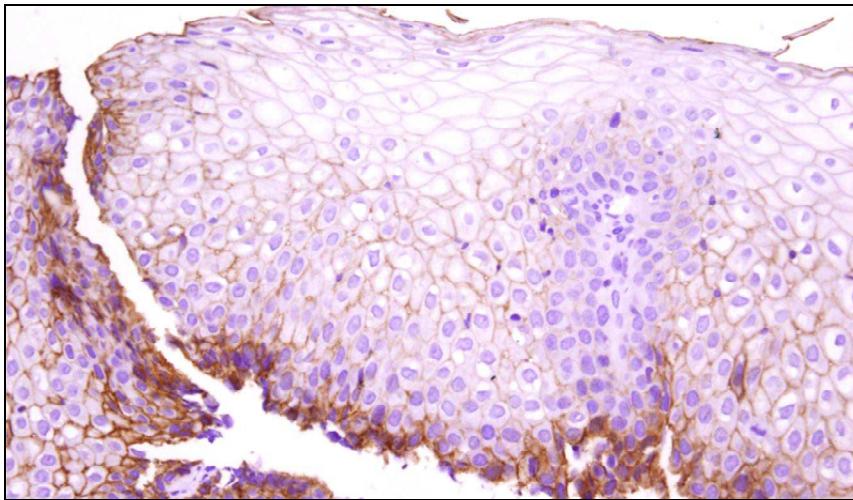
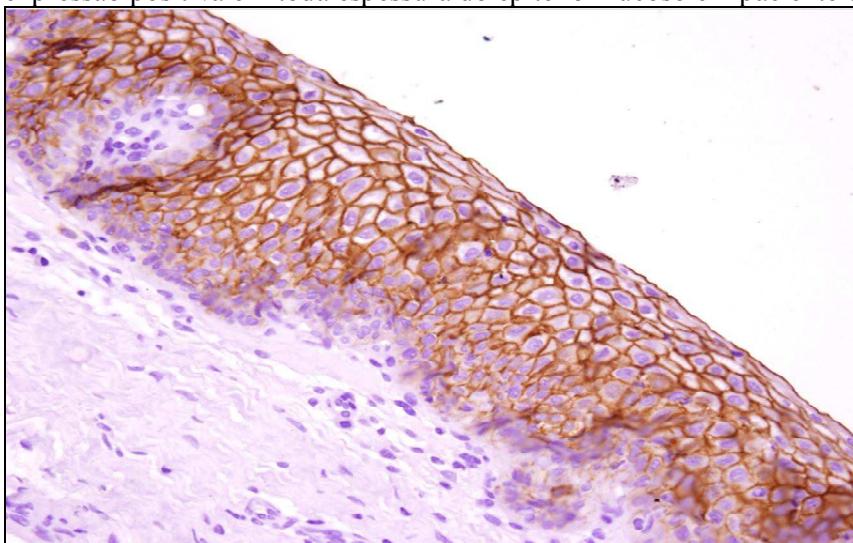


Foto 2 – E-caderina (40X-normal): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando expressão positiva em toda espessura do epitélio mucoso em paciente controle.



#### 4.5 Discussão

A E-caderina é um marcador de integridade epitelial atualmente estudado, estando nos pacientes com EoE desse estudo significativamente subexpressa em relação aos controles. Observação semelhante foi encontrada por autores que, pela técnica de *Western Blot* em biópsias esofágicas, observaram naqueles pacientes diminuição da expressão dessa proteína. [12]

O entendimento do comprometimento da barreira na patogênese da EoE tem despertado interesse no mapeamento de possíveis marcadores de agressão à mucosa esofágica e atividade da doença que não somente o número de eosinófilos. [1,12]

A alteração de permeabilidade relacionada à diminuição da expressão da E-caderina no epitélio tem sido observada em outras doenças, como no câncer, no qual a invasividade e a agressão do tumor correlacionam-se com o comprometimento das forças de adesão da barreira mucosa levando à piora no prognóstico da doença. [19,20,21]

Outras situações nas quais tem sido observada a diminuição das moléculas de adesão no epitélio são em pacientes atópicos, como na asma, sugerindo a importância dessas proteínas no processo observado nessa doença, inclusive regulando a função imunológica inata. [9,22]

Os pacientes desse estudo com diagnóstico de EoE, na quase totalidade eram atópicos, porém não houve diferença na expressão da E-caderina nesses pacientes em relação aos controles, mesmo naqueles com alergia alimentar. A alergia alimentar pode sinalizar uma desregulação na barreira mucosa devido ao seu rompimento. O aumento de permeabilidade com maior susceptibilidade para sensibilização a alérgenos alimentares poderia ser causa ou consequência a injúria da barreira mucosa mas, outros fatores ambientais e inerentes ao próprio indivíduo, podem participar do processo inflamatório observado nessa doença. [12,23]

Com relação aos achados endoscópicos observados, foram semelhantes aos categorizados no *score* de referência proposto por Hirano e colaboradores, inicialmente para adultos e posteriormente em crianças. [24,25] A presença de edema, sulcos, placas brancas, anéis e estenoses durante a endoscopia é frequente nos pacientes com EoE. [13,14,26] Em nossos pacientes, na presença de secreção brancacenta, a qual sinaliza agrupamento de eosinófilos, houve uma maior tendência da subexpressão da E-caderina, podendo sugerir alteração dessa proteína na presença do acúmulo dessas células.

A característica histopatológica considerada o achado chave para diagnóstico e atividade de doença na EoE é a presença do eosinófilo, estabelecido em revisões consensuais como em número de 15 ou mais EOS/CGA, sendo preponderante a presença de EOS em todos os pacientes com EoE desse estudo. Particularmente no grupo com E-caderina subexpressa, foi significante sua maior presença [13,14].

Outras observações histológicas atualmente consideradas relevantes na avaliação da doença, como hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e espongiose ou dilatação dos espaços intercelulares, são consideradas características da atividade do processo

inflamatório e do remodelamento tecidual e foram observadas nas biópsias de nossos pacientes, mas não apresentaram diferença significante em relação aos controles [13,14, 27,28].

A presença da dilatação dos espaços intercelulares não é um achado específico dos pacientes com EoE, sendo encontrado em pacientes com doenças como dermatite atópica, asma e doença inflamatória intestinal, nos quais a quebra da integridade juncional com maior permeabilidade da barreira seria sinal da atividade do processo inflamatório, facilitador à penetração de抗ígenos e sensibilização do paciente [1].

A sintomatologia observada em nossos pacientes foi convergente com a encontrada na disfunção esofágica e DRGE, semelhante aos achados da literatura mundial [13,14,29,30]. Com relação à alteração na expressão da E-caderina (conforme observado na tabela 2), não foi observado diferença entre pacientes sintomáticos ou assintomáticos. Curiosamente nenhum paciente desse estudo com relato de impactação apresentou alteração na expressão da proteína, podendo sugerir que a subexpressão de proteínas juncionais tenha correlação com atividade inflamatória, e a impactação representaria a remodelação tecidual e fibrose, parte de um fenótipo estenótico da doença [31]. Consideramos a importância de novos trabalhos com um número maior de pacientes para melhor percepção da correlação dos diversos sintomas com as proteínas de alteração de barreira esofágica.

O grupo de pacientes avaliado nesse estudo era constituído de crianças e adolescentes em acompanhamento com diagnóstico de doença estabelecido segundo os últimos consensos e em orientação para tratamento (IBP, dieta de exclusão e/ou corticoide inalatório deglutiido). [32,33,34]

Com relação à expressão da E-caderina e ao tratamento realizado, como observado na tabela 5, foi constatado alteração na expressão da proteína de barreira nos pacientes com EoE e em tratamento dietético. Uma possibilidade para essa observação seria a dificuldade das famílias e do próprio paciente na adesão ao tratamento de exclusão de proteínas alimentares, mesmo diante de orientações realizadas por nutricionistas treinados. Chama a atenção que menos da metade de nossos pacientes encontravam-se em dieta de exclusão. Outros autores, avaliando a expressão de proteínas como filagrina e periostina, pré e pós-tratamento dietético dirigido por testes alérgicos e/ ou com corticosteroides em 61 crianças, observaram a restauração das alterações da mucosa esofágica em pacientes com EoE ativa após tratamento. [35]

Muitos de nossos pacientes encontravam-se em uso de inibidor de bomba de prótons (IBP). Os IBPs são considerados por alguns autores como uma modalidade de tratamento, o

qual permite em pacientes pediátricos com EoE remissão histológica e melhora dos sintomas em 54,1 a 64,9% respectivamente, sendo aceito como manejo no diagnóstico inicial da doença [13,14,36]. Em estudo prospectivo que avaliou a expressão de proteínas juncionais (claudina-1, claudina-4, ocludina e zônula ocludina-1 [ZO-1]), utilizando-se análise imuno-histoquímica em pacientes com DRGE refratários ao IBP, observou-se 10% de prevalência de EoE nesses pacientes. Isso poderia sugerir que o acometimento de barreira no esôfago inferior estaria associado a sintomas da disfunção esofágica em alguns pacientes com EoE. [37]

Outra modalidade consensualmente estabelecida para tratamento da EoE é o uso de corticosteroides inalatórios deglutidos, e estudos avaliando a integridade do epitélio do esôfago com relação ao tratamento realizado observaram expressão diminuída das glicoproteínas e elementos de barreira, como filagrina, E-caderina, claudina, ocludina e desmogleína-1 f, independente da terapia com corticosteroides. [13,14,38,39]

Com relação à idade de início dos sintomas, ao tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da EoE e ao tempo de doença até realização da imuno-histoquímica, não percebeu-se diferença estatística na alteração da expressão da E-caderina, sendo importante o acompanhamento desses pacientes por equipe interdisciplinar com nutricionistas e inclusive psicólogos para melhor suporte e garantia de qualidade de vida, sabidamente comprometida nesses pacientes. [40]

Alterações de barreira epitelial em EoE, atualmente tem sido tema de relevante interesse. Pacientes com outros danos esofágicos, como atresia de esôfago reparada ou mesmo aqueles com paralisia cerebral e grave dano esofágico, apresentam eosinofilia esofágica, podendo sinalizar que o dano à mucosa poderia estar centrado na gênese do processo inflamatório, ou esses pacientes poderiam apresentar um perfil molecular semelhante que os predisporia a esses achados. [41,42]

Atualmente a compreensão que a resposta inflamatória poderia induzir a desregulação de citocinas e levar ao desequilíbrio da homeostase epitelial colocou o epitélio esofágico como epicentro da patogênese da EoE. [23]

O papel primário da disfunção da barreira é reforçado por autores que observaram produtos genéticos locais como a linfopeptina estromal tímica e as proteases intracelulares codificadas por genes responsáveis pela suscetibilidade a essa doença. [1]

Muito se tem discutido sobre os aspectos centrais na fisiopatologia dessa doença com enormes progressos em seu entendimento nos últimos anos, mas ainda há lacunas no seu completo conhecimento, formas de apresentação, papel central dos alérgenos alimentares e

ambientais e qual é a importância do comprometimento da barreira da mucosa esofágica no surgimento e perpetuação do processo inflamatório.

Atualmente no Brasil, mesmo com as dificuldades na uniformidade do estabelecimento diagnóstico e tratamento, observarmos crescente número de casos da doença na população pediátrica. Esse é um dos primeiros trabalhos em crianças brasileiras com diagnóstico de EoE, o qual aborda a expressão da E-caderina como sinalizador de comprometimento do epitélio esofágico.

Concluímos que a subexpressão da E-caderina observada nos pacientes com EoE avaliados, sinaliza o comprometimento de barreira nessa doença, sendo necessários estudos posteriores com maior número de pacientes, estratificação de tratamentos e envolvimento de outros centros de acompanhamento dessa doença para aprimorar a percepção e entendimento da importância da integridade da mucosa esofágica e sua correlação com a atividade dessa doença.

#### 4.6 Bibliografia

1. **Scleimer R**, Berdnikovs S. Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**:1752-61 [PMID: 2858447].
2. **Takeichi M**. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 619–627 [PMID: 857335]
3. **Leckband D**, Prakasam A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; **8**: 259–287 [PMID: 16834557 DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095753]
4. **Pokutta S**, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 237–261 [PMID: 17539752 DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104241]
5. **Grunwald GB**. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 797–805 [PMID: 8240823]
6. **Bajpai S**, Correia J, Fenf Y, Figueireso J, Sun SX, Longmore GD, Surlano L, Wirtz D.  $\{\alpha\}$ -Catenin mediates initial E-cadherin dependent cell-cell recognition and subsequent bond strengthening. *Proc Natl Acad Sci* 2008; **105**: 18331–18336 [PMID: 19017792 PMCID: PMC2587611 DOI: 10.1073/pnas.0806783105]
7. **Chan AO**. E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; **12** (2): 199-203 [PMID: 16482618 DOI: 10.3748/wjg.v12.i2.199]

8. **Jeanes A**, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008; **27**: 6920-6929 [PMID: 19029934 DOI: 10.1038/onc.2008.343]
9. **Nawijn MC**, Hackett TL, Postma DS, van Oosterhout AJ, Heijink IH. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends in Immunology* 2011; **32** (6): 248-255 [PMID: 21493142 DOI: 10.1016 / j.it.2011.03.004]
10. **Heijink IH**, Kies PM, Kauffman HF, Postma DS, van Oosterhout AJ, Vellenga E. Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity. *J immunol* 2007; **178**: 7678-85 [PMID: 1754804 DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.7678]
11. **Lee HJ**, Kim B, Im NR, Lee DY, Kim HK, Lee SH, Lee HM, Baek SK, Kim TH. Decreased expression. Of E-cadherin and ZO-1 in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy* 2016; **30**: 173-8 [PMID: 27216347 DOI: 10.2500 / ajra.2016.30.4295]
12. **Abdulnour-Nakhoul SM**, Al-Tawil Y, Gyftopoulos A, Brown KL, Hansen M, Bucher KF, Eidelwein AP, Noel RA, Rabon R, Posta A, Nakhoul NL. Alterations in junctional proteins, inflammatory mediators and extracellular matrix molecules in eosinophilic esophagitis. *Clinical Immunology* 2013; **48** (2): 265-78 [PMID: 23792687 DOI: 10.1016/j.clim.2013.05.004]
13. **Lucendo AJ**, Molina-Infante J, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, Dias JA, Bove M, González-Cervera J, Larsson H, Miehlke S, Papadopoulou A, Sánchez JR, Ravelli A, Ronkainen J, Santander C, Schoepfer AM, Storr M, Terreehorst I, Strumann A, Attwood S. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterology Journal* 2017; **5** (3): 335-58 [PMID: 28507746 PMCID: PMC5415218 DOI: 10.1177/2050640616689525]
14. **Liacouras CA**, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, Burks AW, Chehade M, Collins MH, Dellon ES, Dohil R, Falk GW, Gonsalves N, Gupta SK, DA Katzka, Lucendo AJ, Markowitz JE, Noel RJ, OD de Odze, Putnam PE, JE de Richter, Romero Y, Ruchelli E, Sampson HA, Schoepfer A, Shaheen NJ, SS Sicherer, Spechler S, Spergel JM, Straumann A, BKS Wershil, Rothenberg ME, Aceves SS. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; **128** (1): 3-20 e26 [PMID: 21477849 DOI: 10.1016 / j.jaci.2011.02.040]

15. **Shaheen NJ**, Mukkada V, Eichinger C, Schofield H, Todorova L, Falk GW. Natural history of eosinophilic esophagitis: a systematic review of epidemiology and disease course. *Diseases of the Esophagus* 2018; **31**:1–14 [PMID: 29617744 PMCID: PMC6102800 DOI: 10.1093/dote/doy015]
16. **Arias A**, Perez-Martinez I, Tenias JM, Lucendo AJ. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; **43**: 3-15 [PMID: 26510832 DOI:10.1111 / apt.13441]
17. **Gonçalves LO**, Lopes MMNR, Rezende ERMA, Segundo GRS. Incidence of Childhood Eosinophilic Esophagitis in Central Brazil: How Many Are We Missing? *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018; **28**(4): 241-245 [DOI: 10.18176/jiaci.0241]
18. **Hunt NC**, Douglas Jones AG, Jasani B, JM Morgan, Pignatelli M. Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. *Arch Int J Pathol* 1997; **430** (4): 285-289 [PMID: 9134039]
19. **Siitonen SM**, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-Cadherin Expression Is Associated With Invasiveness and Unfavorable Prognosis in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* 1996; **105**: 394-402 [PMID: 8604681]
20. **Berx L**, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001, **3**: 289–293 [PMID: 11597316 PMCID: PMC138690]
21. **Tunggal JA**, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *The EMBO Journal* 2005; **24** (6):1146-56 [PMID: 15775979 PMCID: PMC556407 DOI: 10.1038 / sj.emboj.7600605]
22. **de Boer WI**, Sharma HS, Baelemans SM, HC Hoogsteden, Lambrecht BN, Braunstahl GJ. Modified expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; **86** (3): 105-12 [PMID: 18418437 DOI: 10.1139/y08-004]
23. **Rochman M**, Nurit PA., Rothenberg ME, et al. Epithelial origin of eosinophilic esophagitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, **142** (1): 10-23 [PMID: 29980278 DOI: 10.1016/j.jaci.2018.05.008]
24. **Hirano I**, Moy N, Heckman MG, Thomas CS, Gonsalves N, Achem SR. Endoscopic assessment of the oesophageal features of eosinophilic oesophagitis: validation of a

- novel classification and grading system. *Gut* 2013; **62** : 489-495 [PMID: 22619364 DOI: 10.1136 / gutjnl-2011-301817]
25. **Wechsler JB**, Bolton SM, K Amsden, Wershil BK, Hirano I, Kagalwalla AF. Eosinophilic Esophagitis Reference Score Accurately Identifies Disease Activity and Treatment Effects in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; **16** (7): 1056–1063 [PMID: 29248734 PMCID: PMC6003847 DOI: 10.1016 / j.cgh.2017.12.019]
  26. **Kim HP**, Vance RB, Shaheen NJ, et al. The prevalence and diagnostic utility of endoscopic features of eosinophilic esophagitis: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; **10**: 988-996 [PMID: 22610003 PMCID: PMC3424367 DOI: 10.1016/j.cgh.2012.04.019]
  27. **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 [PMID: 25023586 DOI: 10.1097/MPG.0000000000000491]
  28. **Katzka DA**, 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 [PMID: 25592662 DOI: 10.1016/j.cgh.2014.12.032]
  29. **Gupte AR**, Draganov PV. Eosinophilic esophagitis. *World J Gastroenterol* 2009 January 7; **15** (1): 17-24 [PMID: 19115464 PMCID: PMC2653291 DOI: 10.3748/wjg.15.17]
  30. **Muñoz-Mendoza D**, Chapa-Rodríguez A, Bahna SL. Eosinophilic Esophagitis Clinical Manifestations and Differential Diagnosis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2018; **55**: 7–18 [PMID: 29290036 DOI: 10.1007/s12016-017-8663-y]
  31. **Aceves SS**, Newbury RO, Dohil R, et al. Esophageal remodelling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**: 206–212 [PMID: 17208603 DOI: 10.1016/j.jaci.2006.10.016]
  32. **Furuta GT**, et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology* October 2007; **133** (4): 1342-63 [PMID: 17919504 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.08.017]
  33. **Liacouras CA**. et al. Eosinophilic esophagitis: Updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* June 2011; **128** (1): 3-20 [PMID: 21477849 DOI: 10.1016/j.jaci.2011.02.040]
  34. **Dellon ES**, et al. Updated International Consensus Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagitis: Proceedings of the AGREE Conference. *Gastroenterology*

- 2018; **155**: 1022–1033 [PMID: 30009819 PMCID: PMC6174113 [Available on 2019-10-01] DOI: 10.1053/j.gastro.2018.07.009]
35. **Politi E**, Angelakopoulou U, Grapsa D, et al. Filaggrin and Periostin Expression Is Altered in Eosinophilic Esophagitis and Normalized With Treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; **65** (1): 47-52 [PMID: 28644349 DOI: 10.1097/MPG.0000000000001419]
36. **Munoz-Persy M**, Lucendo AJ. Treatment of eosinophilic esophagitis in the pediatric patient: an evidence-based approach. *European Journal of Pediatrics* 2018; **177**: 649–663 [PMID: 29549437 DOI: 10.1007/s00431-018-3129-7]
37. **Kenichiro O**, Makoto A, Hideaki I, et al. A Prospective Study of Eosinophilic Esophagitis and the Expression of Tight Junction Proteins in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease Symptoms. *Gut and Liver* 2018 V. **12** (1): 30-37 [PMID: 29032661 PMCID: PMC5753681 DOI: 10.5009/gnl16600]
38. **Wechsler JB**, Bolton SM, K Amsden, Wershil BK, Hirano I, Kagalwalla AF. Eosinophilic Esophagitis Reference Score Accurately Identifies Disease Activity and Treatment Effects in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; **16** (7): 1056–1063 [PMID: 29248734 PMCID: PMC6003847 DOI: 10.1016/j.cgh.2017.12.019]
39. **Simon D**, Page D, Vogel M, et al. Evidence of an abnormal epithelial barrier in active, untreated and corticosteroid-treated eosinophilic esophagitis. *Allergy* 2018; **73**: 239-47 [PMID: 28712126 DOI: 10.1111/all.13244]
40. **Mukkada V**, Falk GW, Eichinger CR, Rei D, Todorova L, Shaheen NJ. Health-Related Quality of Life and Costs Associated With Eosinophilic Esophagitis: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018. **16** (4): 495-503 [PMID: 28655543 DOI: 10.1016/j.cgh.2017.06.036]
41. **Nápolis ACN**, Alves FA, Rezende ERMA, Segundo GRS. Esophageal eosinophilia in pediatric patients with cerebral palsy. *Einstein* 2015; **13** (2): 232-7 [PMID: 26154544 PMCID: PMC4943815 DOI: 10.1590/S1679-45082015AO3266]
42. **Krishnan U**, et al. Analysis of eosinophilic esophagitis in children with repaired congenital esophageal atresia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 0, Issue 0 , (in press) [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.040>]

## **5 ARTIGO 2. “EXPRESSÃO DA FILAGRINA NA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ESOFAGITE EOSINOFÍLICA”**

Tipo de manuscrito: Estudo Caso controle

### **Filagrina: comprometimento de barreira e Esofagite Eosinofílica**

Rezende ERMA et al. Comprometimento de barreira e Esofagite Eosinofílica

Autores: Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende<sup>1</sup>, Mariza Rodrigues de Faria<sup>2</sup>, Juliana Salomão Daud<sup>3</sup>, Ignez Candelori<sup>3</sup>, Flávia Araújo Alves<sup>4</sup>, Cristina Palmer Barros<sup>2</sup>, Jair da Cunha Junior<sup>5</sup>, Gesmar Rodrigues da Silva Segundo<sup>1,5</sup>

1 Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Uberlândia

2 Departamento de Endoscopia Digestiva da Universidade Federal de Uberlândia

3 Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia

4 Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade federal de Uberlândia

5 Departamento de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia

Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia Minas Gerais – Brasil

Correspondência: Érica Rodrigues Mariano de Almeida Rezende

Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Uberlândia – Brasil

[ericamarianor@gmail.com](mailto:ericamarianor@gmail.com)

### **5.1 Resumo**

**Introdução:** O comprometimento da superfície da pele e das mucosas, com alterações das proteínas responsáveis pela integridade da barreira epitelial, como a filagrina (FLG), componente importante da camada córnea, tem sido apontado como foco no estudo de várias doenças alérgicas, como a esofagite eosinofílica (EoE). A EoE é uma doença crônica, emergente, causadora de sintomas de disfunção esofágica. O diagnóstico é realizado através da presença de processo inflamatório na mucosa esofágica com predomínio de eosinófilos. A correlação da EoE com alterações da barreira epitelial pode auxiliar no entendimento da

patogenia dessa doença. O objetivo desse estudo é avaliar a expressão da FLG em pacientes pediátricos e adolescentes com EoE. **Métodos:** biópsias esofágicas de 24 pacientes com EoE e 17 controles foram realizadas. Alterações microscópicas: número de eosinófilos, microabcessos eosinofílicos, alongamento de papilas, hiperplasia da camada basal e espongiosis foram avaliadas. A expressão da FLG no epitélio desses pacientes foi avaliada por imuno-histoquímica. **Resultados:** 15 (62,5%) dos pacientes com EoE eram do sexo masculino, idade média de 10,8 anos (+-0,91). Onze (45,8%) apresentavam alergia alimentar. A média de eosinófilos nos pacientes com EoE foi de 41,5 (33,03-70,39). Alterações histológicas foram significativamente maiores nesse grupo ( $p<0,05$ ), particularmente espongiosis e hiperplasia da camada basal presente em 21 (87,5%) pacientes. Não houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) da expressão da FLG em relação aos controles. **Conclusão:** A FLG, importante proteína da integridade do epitélio, veio subexpressa nos pacientes com EoE semelhante aos controles, não sendo considerada marcador de alteração de barreira epitelial nesses pacientes.

**Palavras-chave:** Filagrina. Barreira epitelial. Esofagite eosinofílica.

## 5.2 Introdução

O comprometimento da superfície da pele e das mucosas com alteração das proteínas dessas superfícies tem sido apontado como uma porta de entrada para muitos alérgenos, com aumento do risco de sensibilização em doenças como dermatite atópica (DA), asma, rinite e esofagite eosinofílica (EoE).<sup>1</sup>

O esôfago é composto por epitélio escamoso estratificado, semelhante ao da pele, porém na ausência da camada córnea está presente uma camada mucosa, com estrutura comprometida na EoE, levando a um processo inflamatório com eosinofilia predominante além de achados teciduais como hiperplasia da camada basal, alongamento de papilas e espongiosis ou aumento do espaço intercelular.<sup>2</sup>

Atualmente doença alérgica emergente, a EoE pode causar sintomas de disfunção esofágica como vômitos, disfagia e impactação.<sup>3</sup> O diagnóstico consensualmente aceito, necessita do eosinófilo como elemento chave, e atualmente tem o epicentro de sua patogenia no comprometimento da barreira esofágica, com sinalização de disfunção da matriz proteica responsável pela estruturação epitelial.<sup>3,4,5</sup>

Entre as proteínas responsáveis pela integridade epitelial, a filagrina (“*FILlament*

*AGGRegation proteIN FLG*), proteína agregadora de filamentos, maior componente da camada córnea da pele, com 36 kDa, formada a partir da profilagrina, é a matriz na fase final de diferenciação epidérmica dos queratinócitos. É responsável pela barreira de proteção e preservação da epiderme, estando presente em vários órgãos, como cavidade oral, cérvix, endométrio e derme.<sup>6,7,8</sup>

Alterações no gene codificador da FLG, localizado no cromossomo 1q21, com prejuízo em sua função como elemento estrutural, podem levar a defeitos nessa barreira, observados em várias doenças alérgicas, sendo bem descrito na DA.<sup>9,10</sup>

Muitos são os esforços para compreender o papel do comprometimento histológico e das proteínas responsáveis pela integridade da epiderme nas doenças alérgicas, e esse estudo objetiva analisar as alterações teciduais e a expressão da FLG na mucosa de pacientes pediátricos e adolescentes com EoE.

### **5.3 Material e métodos**

#### **Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (CEP/UFU número: 37330414.3.0000.5152). Os responsáveis legais pelos participantes e os participantes adolescentes assinaram Termo de Consentimento e/ou Assentimento Livre Esclarecido.

#### **População do Estudo**

Os pacientes com EoE e outras patologias gastrointestinais com idades entre 0 e 18 anos, acompanhados nos Ambulatórios de Alergia Alimentar e de Gastroenterologia Infantil do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (Brasil), foram convidados a participar do estudo no período de junho de 2015 a junho de 2018. Vinte quatro pacientes com EoE e 17 pacientes controles foram admitidos no estudo. Os dados relativos à epidemiologia foram coletados por meio do prontuário médico do paciente.

#### **Endoscopia digestiva alta**

Os exames endoscópicos foram realizados no setor de Endoscopia da mesma unidade, sob sedação anestésica, por dois endoscopistas pediátricos experientes, utilizando os aparelhos Olympus XP-150, XP-140 e GIF-XP 160, de acordo com o tamanho da criança. Foram coletados fragmentos de mucosa esofágica, três em esôfago médio e três em esôfago inferior, estômago e duodeno para realização do anátomo-patológico. Os achados endoscópicos foram registrados em prontuário médico.

### **Análise histológica**

Os fragmentos retirados durante a EDA foram conservados em formalina tamponada a 10% e incluídos em parafina, seccionados em fatias de três micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, corados pela hematoxilina e eosina e analisados em microscópio óptico (Olympus BX 41) com aumento de 400 vezes por patologista treinado para determinar: presença e quantidade de eosinófilos, presença e alongamento das papilas dérmicas, presença e intensidade de hiperplasia da camada basal, presença e intensidade de espaços intercelulares e presença de microabscessos de eosinófilos.

### **Análise Imuno-histoquímica**

Secções dos espécimes de biópsia incluídos em parafina, com espessura aproximada de 3  $\mu\text{m}$ , foram colocadas sobre lâminas histológicas tratadas com 3-Aminopropyltriethoxsilane (SIGMA, Chemical Co., USA); desparafinizadas em xanol (2 banhos de 20 minutos cada), hidratadas em concentrações decrescentes de etanol, lavadas em água corrente (10 minutos) e submetidas a resgate antigênico pelo calor, com a utilização do tampão EDTA (0,3722 g de EDTA para 1000 ml de tampão, pH 8,03) e aquecidas em forno de microondas, alta potência, (3 ciclos de 5 minutos). Resfriadas por 20 minutos, lavadas em água corrente e bloqueada a atividade da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes (4 banhos de 3 minutos). Após lavadas em água corrente e imersas em PBS (Tampão fosfato salina) pH 7,4, foram incubadas por 18 horas a 5°C com o anticorpo monoclonal de FLG (AE21), produzido em camundongo IgG, 200 microgramas/ml – Santa Cruz Biootechnology, USA).

A coloração foi desenvolvida por incubação com a solução reveladora substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina em PBS pH 7,4, durante 5 minutos, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris (1 a 2 minutos). As lâminas foram desidratadas

em soluções crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com lamínulas e goma de Damar. Os controles positivos foram realizados de secções teciduais de pele, os quais sabidamente expressem os抗ígenos pesquisados (figura 3). Considerou-se expressão presente quando a coloração era detectada em toda a espessura do epitélio mucoso e subexpressão quando havia áreas de coloração negativa nos dois terços superiores da mucosa.

### Análise estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade da distribuição das variáveis. Para as variáveis categóricas, foram utilizados o teste de Qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher, quando a frequência foi menor que cinco. Para análise da mediana da idade, foi utilizado o teste de t de Student não pareado para determinar diferença estatística entre o grupo que apresenta EoE e o grupo controle. Para as variáveis numéricas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. ANOVA foi utilizada para comparar a média do número de eosinófilos com relação às doenças atópicas observadas. O nível de significância para todas as análises foi de  $p<0,05$ . As análises foram realizadas usando os programas GraphPadPrism 7.0a (La Jolla, California, USA) e SPSS Statistics 24 (Armonk, NY, USA).

### 5.4 Resultados

A tabela 1 demonstra os dados epidemiológicos dos pacientes com EoE e os controles. Não foi observada diferença estatística na idade e no sexo dos pacientes caso e controles. A presença de alergia alimentar foi significativamente mais elevada nos pacientes com EoE em relação aos controles, mas não houve diferenças para as demais doenças atópicas (asma, rinite alérgica e dermatite atópica).

Tabela 1 – Dados epidemiológicos observados nos pacientes com EoE e controles

	EoE	Não EoE	P
Dados epidemiológicos	n=24	n=17	
Idade (anos) <sup>a</sup>	$10,8 \pm 0,91$	$8,6 \pm 0,89$	0,1166
média $\pm$ DP			
Gênero <sup>b</sup>			
Masculino	15 (62,5%)	10 (58,8 %)	0,2159
(%)			

Asma <sup>b</sup> (%)	9 (37,5%)	2 (11,7%)	0,0855
Rinite <sup>b</sup> (%)	13 (54,1%)	14 (82,3%)	0,3211
Dermatite Atópica <sup>b</sup> (%)	5 (20,8%)	0 (0,0%)	0,0650
Alergia Alimentar <sup>b</sup> (%)	11 (45,8%)	0 (0,0%)	0,0009 *

a -Teste t, b -Teste Exato de Fisher, \* $p<0,01$ , DP- desvio padrão

Observa-se que os pacientes com EoE apresentaram alterações microscópicas significativamente distintas do grupo controle em relação aos achados microscópicos: número de eosinófilos, microabcessos eosinofílicos, alongamento de papilas, hiperplasia de células da camada basal e espongiose conforme observado na tabela 2.

Tabela 2 – Achados histológicos nos pacientes com EoE e controles

Achados histológicos	EoE n=24	Não EoE n=17	p
Número de Eosinófilos <sup>a</sup> mediana±(IC)	41,5 (33,03-70,39)	0 (0,10-1,78)	<0,0001 *
Microabcessos eosinofílicos <sup>b</sup> (%)	8 (33,3%)	0 (0,0%)	0,0128 *
Alongamento de papilas <sup>c</sup> (%)	18 (75%)	12 (70,5%)	0,7534
Hiperplasia da camada basal <sup>c</sup> (%)	21 (87,5%)	7 (41,1%)	0,0026*
Espongiose <sup>c</sup> (%)	21 (87,5%)	5 (29,4%)	0,0002*

a- Mann-Whitney, b- Teste Exato de Fisher, c- Teste Qui-quadrado, \* $p<0,05$ , IC- intervalo de confiança

Na tabela 3, observa-se que entre os pacientes com EoE a média do número de EOS observados na microscopia esofágica não apresentou diferença significativa em relação a doença atópica relatada pelo paciente.

Tabela 3 – Número de eosinófilos correlacionado às doenças atópicas nos pacientes com EoE

Doença atópica (pacientes EoE)	n=24	eosinófilos (média ± DP)	p
Asma <sup>a</sup> (%)	9 (37,5%)	49,8 ± 39,5	0,9235
Rinite <sup>a</sup> (%)	13 (54,1%)	59 ± 46,8	

---

Dermatite Atópica <sup>a</sup> (%)	5 (20,8%)	$64,2 \pm 63,6$	
Alergia Alimentar <sup>a</sup> (%)	11 (45,8%)	$52 \pm 37,7$	
Duas ou mais doenças atópicas <sup>b</sup> (%)	9 (37,5%)	$60,2 \pm 51,1$	0,4775

---

a -ANOVA, b -teste t, DP- desvio padrão

Figura 1 – Achados histológicos observados nos pacientes com EoE: (A) alongamento de papilas, (B) hiperplasia da camada basal, (C) espongiose, (D) micorabcessos eosinofílicos

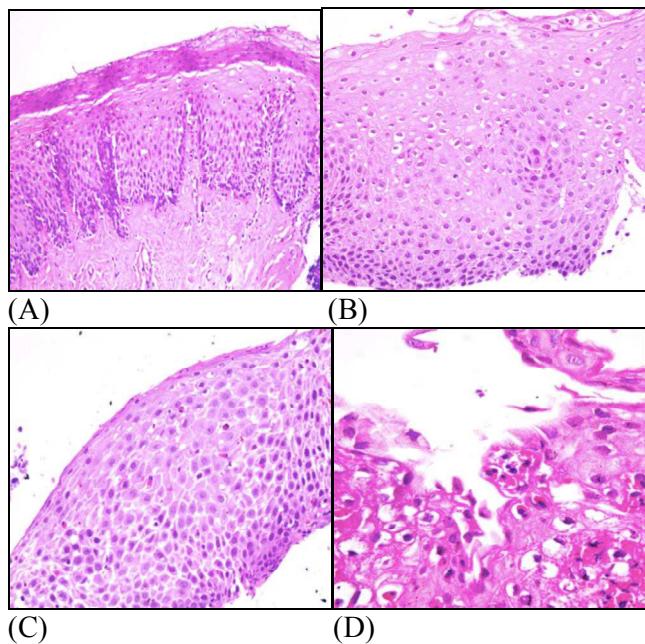


Figura 2 – Fotomicrografia da expressão da FLG no esôfago, mostrando ausência de expressão em paciente com EoE (A) e em paciente controle (B)

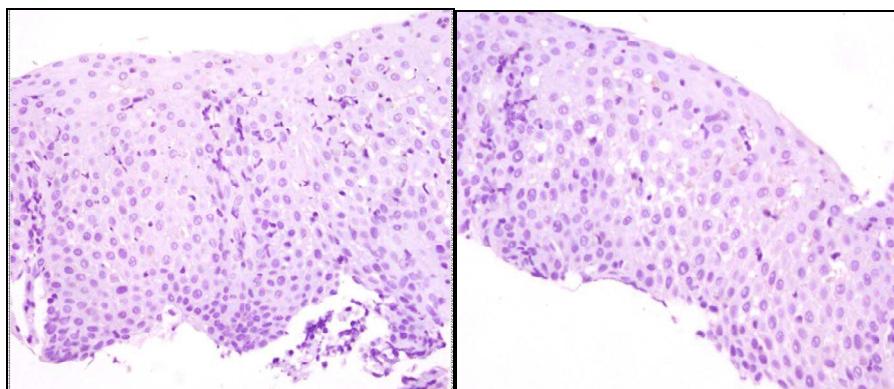
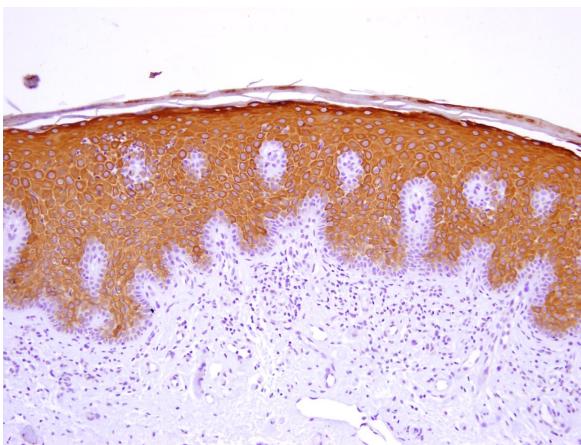


Figura 3 – Fotomicrografia de controle positivo da filagrina na pele, mostrando expressão da proteína nas camadas espinhosa e córnea.



### 5.5 Discussão

Os estudos atuais apontam que, além da presença de eosinófilos na EoE, outras alterações de comprometimento da barreira mucosa são relevantes na avaliação do processo inflamatório, semelhante as outras doenças alérgicas Th2.<sup>11</sup>

Os nossos pacientes, em sua maioria escolares do sexo masculino, apresentavam um perfil atópico, mas principalmente alergia alimentar, conforme observado na tabela 1, sendo esses achados convergentes com aqueles encontrados na literatura mundial.<sup>3,4</sup> A eosinofilia presente na mucosa esofágica foi pujante (figura 1 D), definindo a eles o diagnóstico, não havendo diferença estatística percebida quanto à presença de uma ou mais doenças atópicas associadas e a média do número de células encontrado (tabela 3).<sup>3,4</sup>

Outras alterações histológicas significativas observadas nos pacientes com EoE (tabela 2) foram a hiperplasia da camada basal, o alongamento das papilas e a espongiose ou aumento do espaçamento intercelular, este último achado condizente com o aumento de permeabilidade e potencial sensibilização alérgênica nesses pacientes. Esses achados foram semelhantes àqueles encontrados na literatura mundial.<sup>3,4,12</sup>

A hiperplasia da camada basal habitualmente encontrada nesses pacientes como parte do processo de remodelamento após a agressão ao epitélio esofágico é semelhante àquela observada em pacientes com severa doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), e foi achado relevante na análise histológica dos pacientes desse estudo (tabela 2, figura 1 B).<sup>13</sup>

As papilas, extensões de tecido conjuntivo vascularizado da lâmina própria em direção à camada epitelial, quando alongadas (acima de 75% da espessura do epitélio), são outros achados indicadores de lesão tecidual já descritos em quadros severos da DRGE e também na EoE, mas conforme observado na figura 1, não apresentaram diferença significativa em relação aos controles (tabela 2, figura 1 A).<sup>2,14,15,16</sup>

A espongiose é descrita na avaliação histológica de pacientes com DRGE e EoE, refletindo a intensidade da lesão. A dilatação dos espaços intercelulares observada nos pacientes com EoE, apesar de não específica para esse grupo, sinaliza aumento da permeabilidade epitelial e comprometimento da barreira, atualmente foco de interesse na patogenia dessa doença. Essa alteração foi pronunciada nos nossos pacientes com EoE, sugerindo comprometimento das proteínas juncionais e pode ser considerada fator facilitador para sensibilização alergênica pelo aumento de permeabilidade, ou consequência do próprio processo inflamatório instalado (tabela 2, figura 1 C).<sup>1,2,13,16,17</sup>

Atualmente, além das alterações histológicas e do infiltrado de eosinófilos (figuras 1 A, B, C, D), tem sido discutido as alterações na expressão de proteínas reguladoras da arquitetura epitelial como a E-caderina, vimentina, desmogleína e a FLG.<sup>1,18,19</sup>

A FLG é uma proteína que contribui para a barreira epitelial estratificada e tem sido estudada também no epitélio esofágico.<sup>1,7,9</sup> Alguns autores, comparando células epiteliais esofágicas humanas primárias cultivadas e estimuladas com IL-3 em sistema ar-líquido e controles saudáveis, observaram outras proteínas de oclusão, como ocludina e ZO-1 aumentadas e o nível de FLG diminuído, o qual poderia sinalizar alteração da camada celular diferenciada e predispor ao aumento da permeabilidade da mucosa.<sup>20,21</sup>

Alterações da barreira epitelial na EoE são observados inclusive com estudos os quais associam essa doença com o genoma 2p23, o qual abrange o gene da calpaína 14, responsável pela integridade da pele e mucosas. A participação das várias proteínas estruturais, participantes da integridade desse epitélio merecem ser melhor elucidada.<sup>22</sup>

A filagrina, maior componente da camada epidérmica, esteve subexpressa em pacientes com EoE ativa, sendo relatada reversão da expressão após tratamento com corticosteroide, em trabalho comparando EoE e pacientes com DRGE.<sup>4,21</sup>

Em nossos pacientes, curiosamente esteve subexpressa naqueles com EoE e nos controles, independente da presença de espongiose e outros achados histológicos (tabela 2). Questionamento sobre a heterogeneidade do grupo analisado com relação ao tratamento e tempo de doença, e mesmo sobre a presença dessa proteína no tecido não queratinizado do esôfago foi levantado. Achado relevante foi a observação do anticorpo marcador em tecido de

pele positivo, uma vez que a FLG é considerada primeira linha da defesa e proteção nesse tecido (figura 3).<sup>23</sup>

Está claro que a barreira esofágica, pela sua inerente vulnerabilidade, sofre mudanças no estado de doença com alterações de nível microscópico. A desregulação das proteínas interjuncionais, agressões ao epitélio e posterior regeneração poderia levar a alterações microscópicas, remodelamento e posterior disfunção do órgão.<sup>24,25</sup>

Achados histológicos observados em nossos pacientes, como hiperplasia da camada basal, infiltrado eosinofílico, espaçamento intercelular, não foram acompanhados de diferença na expressão da filagrina na mucosa esofágica, mesmo diante de pacientes com marcada expressão atópica, como os pacientes com EoE, sugerindo que revestimentos epiteliais diferentes podem apresentar expressão distinta das proteínas de barreira. Nossa observação se aproxima de alguns autores os quais, não observaram expressão dessa proteína em vias aéreas e epitélio esofágico normal, considerando a presença de sua expressão somente em epitélios queratinizados.<sup>26</sup>

Na EoE, alguns autores acreditam que a reação inflamatória ocorra a partir de抗ígenos apresentados às células dendríticas da mucosa e, assim, discute-se o papel de alterações morfológicas e teciduais que evoluem com melhora com terapia com corticosteróides e dieta, e apesar da expressão do gene codificador da FLG estar reduzido nesses pacientes, ainda há lacunas no completo entendimento da redução dessa proteína no tecido.<sup>8,11,27,28,29</sup>

Concluímos que as alterações histológicas observadas no grupo de pacientes com EoE desse estudo são semelhantes àquelas descritas na literatura. Essas alterações teciduais podem ser responsáveis pelo aumento de permeabilidade e possível sensibilização alérgica, particularmente a alergia alimentar, comumente encontrada nesses pacientes, ou serem consequências do processo inflamatório original.

A expressão da FLG, apesar de considerada importante proteína na integridade da barreira epitelial, veio subexpressa nesses pacientes, mas também nos pacientes controle, não sendo considerada marcador de alteração de barreira nos pacientes avaliados.

A realização de novos estudos, com número maior de pacientes e refinamento do grupo controle, além da utilização de microscopia eletrônica de alta resolução para melhor caracterização da espongiosa e da distribuição das proteínas juncionais, serão importantes para maior clareza do papel da expressão dessa proteína como marcador de atividade inflamatória em pacientes com EoE.

ORCID dos pesquisadores:

Conflito de interesses: os autores declaram não possuírem conflito de interesses para execução desta pesquisa

## 5.6 Referências

1. Schleimer R, Berdnikov S. Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1752-1761. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.010.
2. Denardi FG, Riddell RH. Esophagus. In: STACEY E. MILLS. *Histology for pathologists*. 4th Ed. Estados Unidos: Lippincott, 2012:565-588.
3. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(1):3-20. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.040.
4. Lucendo AJ, Molina-Infante J, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, Dias JA, Bove M, González-Cervera J, Larsson H, Miehlke S, Papadopoulou A, Sánchez JR, Ravelli A, Ronkainen J, Santander C, Schoepfer AM, Storr M, Terreehorst I, Strumann A, Attwood S. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterology Journal.* 2017;5(3):335-358. doi: 10.1177/2050640616689525.
5. Rochman M, Nurit PA., Rothenberg ME, et al. Epithelial origin of eosinophilic esophagitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2018;142(1):10-23. doi: 10.1016/j.jaci.2018.05.008.
6. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Ecclestone JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(7):4097-4101. doi: 10.1073/pnas.78.7.4097.
7. Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int.* 2011;60(1):1-9. doi: 10.2332/allergolint.10-RAI-0270.
8. McGrath JA. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australas J Dermatol.* 2008;49(2):67-73. doi: 10.1111/j.1440-0960.2008.00443.x
9. Tan HT, Ellis JA, Koplin JJ, et al. Filaggrin loss-of-function mutations do not predict food allergy over and above the risk of food sensitization among infants. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(5):1211-1213. doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.022.

10. Palmer CN, Irvine AD, Kwiatkowski AT, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006;38(4):441-446. DOI:10.1038/ng1767
11. Davis BP. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. *Clinical reviews in Allergy & Immunology.* 2018;55(1):19-42. doi: 10.1007/s12016-017-8665-9.
12. Rosenkrans SL, Baan B, Muncan V, van den Brink GR. Esophageal development and epithelial homeostasis. *Am J PhysiolGAstroenterol Liver Phisiol.* 2015;309(4):216-28. doi: 10.1152/ajpgi.00088.2015.
13. Ravelli AM, Villanacci V, Ruzzenenti N, Grigolato P, Tobanelli P, Klersy C, et al. Dilated intercellular spaces: a major morphological fature of esophagitis. *J Pediatr GAstroenterol Nutr.* 2006;42:510-515. DOI: 10.1097/01.mpg.0000215312.78664.b9
14. Katzka DA, Ravi K, Geno DM, Smyrk TC, Iyer PG. 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. doi: 10.1016/j.cgh.2014.12.032.
15. Steiner SJ, Kernek KM, Fitzgerald JF. Severity of basal cell hyperplasia differs in reflux versus eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42(5):506-509. DOI: 10.1097/01.mpg.0000221906.06899.1b
16. Collins MH. Histopathology of Eosinophilic Esophagitis. *Dig Dis.* 2014;32(1-2):68-73. doi: 10.1159/000357012.
17. Fiocca R, Mastracci L, Milione M, Parente, P, Savarino V. Microscopic esophagitis and Barrets's esophagus: The histology report. *Dig Liver Dis.* 2011;43(4):319-330. doi: 10.1016/S1590-8658(11)60588-4.
18. Ravelli AM, Villanacci V, Cadei M, Fuoti M, Gennati G, Salemme M. Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;59(5):589-593. doi: 10.1097/MPG.0000000000000491.
19. Blanchard C, Simon S, Schoepfer A, Straumann A, Simon HU. Eosinophilic esophagitis: unclear roles of IgE and eosinophils. *Journal of Internal Medicine.* 2017;281(5):448-457. doi: 10.1111/joim.12568.
20. Simon D, Page D, Vogel M, et al. Evidence of an abnormal epithelial barrier in active, untreated and corticosteroid-treated eosinophilic esophagitis. *Allergy.* 2018;73(1):239-247. doi: 10.1111/all.13244.
21. Tadayuki O, Liping W, Masato T, Toshihiko T, Yoshio O, Hirokazu F, Jiro W, Hiroto M. Filaggrin and tight junction proteins are crucial for esophageal mucosal barrier in

- Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*. 2017;152(5):853-854. DOI: 10.1016/S0016-5085(17)32940-2
22. Davis BP, Stucke EM, Khorki ME, Litosh VA, Rymer JK, Rochman M, Travers J, Kottyan LC, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis-linked calpain 14 is an IL-13-induced protease that mediates esophageal epithelial barrier impairment. *JCI Insight*. 2016;1(4):e86355. DOI: 10.1172/jci.insight.86355
  23. Politi E, Angelakopoulou U, Grapsa D, Zande H, Stefanaki K, Panagiotou I, Roma E, Syrigou E. Expression of filaggrin and periostin is altered in eosinophilic esophagitis and normalized with treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(1):47-52. doi: 10.1097/MPG.0000000000001419.
  24. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science*. 2009;122(Pt 9):1285-1294. doi: 10.1242/jcs.033969.
  25. Aceves SS, Newbury RO, Dohil R, et al. Esophageal remodelling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):206-212. DOI:10.1016/j.jaci.2006.10.016.
  26. Blevinss CH, Iyer PG, Vela MF, Katzka DA. The esophageal epithelial barrier in health and disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018;16(5):608-617. DOI: 10.1016/j.cgh.2017.06.035
  27. Benedetto AD, Qualia CM, Baroody FM, Beck LA. Filaggrin Expression in Oral, Nasal, and Esophageal Mucosa. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(6):1594-1597. doi: 10.1038/sj.jid.5701208.
  28. Katzka DA, Tadi R, Smyrk TC, et al. Effects of topical steroids on tight junction proteins and spongiosis in esophageal epithelia of patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(11):1824-1829. doi: 10.1016/j.cgh.2014.02.039.
  29. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K, et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *J Immunol*. 2010;184(7): 4033-4041. doi: 10.4049/jimmunol.0903069.
  30. van Rhijn BD, Verheij J, van den Bergh W, et al. The histological response to fluticasone propionate in patients with eosinophilic esophagitis is associated with an improvement in the functional integrity of the esophageal mucosa. *Sou J Gastroenterol*. 2015;110(9):1289–1297. doi: 10.1038/ajg.2015.247.

## REFERÊNCIAS

ABDULNOUR-NAKHOUL, S. M.; et al. Alterations in junctional proteins, inflammatory mediators and extracellular matrix molecules in eosinophilic esophagitis. **Clinical Immunology**, v. 48, n.2, p. 265-78, 2013. [PMID: 23792687 DOI: 10.1016/j.clim.2013.05.004]

ABONIA, J. P.; et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 1, p. 140–149, 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.009.

ABONIA, J. P; Rothenberg, M. E. Eosinophilic esophagitis: rapidly advancing insights. **Annu Rev Med**, v. 63, n. 1, p. 421-434, 2012. doi: 10.1146/annurev-med-041610-134138.

ABONIA, J. P.; et al. High prevalence of eosinophilic esophagitis in patients with inherited connective tissue disorders. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, 2013. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.030.

ACEVES, S. S.; et al. Mast cells infiltrate the esophageal smooth muscle in patients with eosinophilic esophagitis, express TGF- $\beta$ 1, and increase esophageal smooth muscle contraction. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 1, p. 1298-1204, 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2010.08.050.

ACEVES, S. S. Tissue remodeling in patients with eosinophilic esophagitis: What lies beneath the surface? **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 5, p. 1047-9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.026>

ACEVES, S. S. Remodeling and Fibrosis in Chronic Eosinophil Inflammation. **Dig Dis**, v. 32, n. 1-2, p. 15-21, 2014. doi: 10.1159/000357004.

ALEXANDER, E. S.; et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 5, p. 1084-1092, 2014. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.021.

ANDREAE, D. A.; et al. Swallowed fluticasone propionate is an effective long-term maintenance therapy for children with eosinophilic esophagitis. **Am. J. Gastroenterol**, v. 111, n. 8, p. 1187-97, 2016. doi: 10.1038/ajg.2016.238.

ARIAS, A.; Lucendo, A. J. Prevalence of eosinophilic oesophagitis in adult patients in a central region of Spain. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 1, p. 208-12, 2013. doi: 10.1097/MEG.0b013e32835a4c95.

ARIAS, A.; et al. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 43, n.2, p. 3-15, 2016. [PMID: 26510832 DOI:10.1111 / apt.13441]

ATTWOOD, S. E. A.; SMYRK, T. C.; DEMEESTER, T. R. Eosinophilic asthmaepisodic dysphagia with eosinophilic infiltrates. **Gut**, v. 30, p.A 1493, 1989.

ATTWOOD, S. E.; et al. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. **Dig Dis Sci**, v. 38, n. 1, p. 109-116, 1993.

BLANCHARD, C.; et al. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. **J Clin Invest**, v. 116, n. 2, p. 536-547, 2006.  
DOI:10.1172/JCI26679

BLANCHARD, C.; et al. A striking local esophageal cytokine expression profile in eosinophilic esophagitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 127, n. 1, p. 208-217, 2011. doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.039.

BLEVINS, C. H.; et al. The Esophageal Epithelial Barrier in Health and Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 5, 608-617, 2018. DOI: 10.1016/j.cgh.2017.06.035

CALDWELL, J. M.; PAUL, M.; ROTHNBERG, M. E. Novel Immunologic mechanisms in eosinophilic esophagitis. **Current Opinion in Immunology**, v. 48, n. p. 114-121, 2017. doi: 10.1016/j.coim.2017.08.006.

CASE, C.; et al. Diet and Stress in Pediatric Eosinophilic Esophagitis **J Pediatric gastroenterol Immunol**, v. 65, n. 3, p. 281-284, 2017. DOI: 10.1097/MPG.0000000000001481

CHEHADE, M., ACEVES, S. S. Food allergy and eosinophilic esophagitis. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 10, n. 3, p. 231-7, 2010. doi: 10.1097/ACI.0b013e328338cbab.

CHEN, Y.; et al. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos. **J Cell Biol**, v. 138, n. 4, p. 891-899, 1997.  
DOI:10.1083/jcb.138.4.891

CROESSE, J.; et al. Clinical and endoscopic features of eosinophilic esophagitis in adults. **Gastrointest Endoscop**, v. 58, n. 4, p. 516-522, 2003. PMID: 14520283

DAVIS, B. P.; ROTHENBERG, M. E. Antigen presentation by eosinophils in eosinophilic esophagitis? **J Pediatr Gastroenterol Immunol**, v. 56, n. 3, p. 242-51, 2013. doi: 10.1097/MPG.0b013e31827ab8d3.

DAVIS, B. P. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 55, n. 1, p. 19-42, 2018. doi: 10.1007/s12016-017-8665-9.

DEBROSSE, C.W.; et al. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. **Pediatr Dev Pathol**, v. 9, n. 3, p. 210-218, 2006. DOI:10.2350/11-05-0130.1

DELLON, E. S.; et al. Inverse association of esophageal eosinophilia with *Helicobacter pylori* based on analysis of a US pathology database. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1586–1592, 2011. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.081.

DELLON, E. S.; SPECK, O.; WOODEARD, K. The Patchy Nature of Esophageal Eosinophilia in Eosinophilic Esophagitis: Insights From Pathology Samples From a Clinical Trial. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(12\)61626-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(12)61626-6)

DELLON, E. S. et al. Clinical and endoscopic characteristics do not reliably differentiate PPI-responsive esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis in patients undergoing upper endoscopy: a prospective cohort study. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 12, p. 1854-60, 2013. doi: 10.1038/ajg.2013.363.

DELLON, E. S.; et al. Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in the United States. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 79, n. 4, p. 577-585, 2014. doi: 10.1016/j.cgh.2013.09.008.

DELLON, E. S.; HIRANO, I. Epidemiology and Natural History of Eosinophilic. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 319–332, 2018. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.067.

DELLON, E. S.; et al. Updated International Consensus Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagitis: Proceedings of the AGREE Conference. **Gastroenterology**, v. 155, n. 4, p. 1022-1033, 2018a. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.07.009]

DELLON, E. S.; et al. Serum autoantibodies against epithelial cell adhesion molecules as disease biomarkers of eosinophilic esophagitis. **Clin Exp Allergy**, v. 48, n. 3, p. 343-346, 2018b. doi: 10.1111/cea.13070.

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

DOBBINS, J.W.; SHEAHAN, D.; BEHAR, J. Eosinophilic gastroenteritis with esophageal involvement. **Gastroenterology**, v. 72, n. 6, p. 1312-1316, 1977. PMID:870380

DRANOYE, J. E.; et al. Predictors of response to proton pump inhibitor therapy among children with significant esophageal eosinophilia. **J Pediatr**, v. 154, v. 1, p. 96-100, 2009. doi: 10.1016/j.jpeds.2008.07.042.

FERREIRA, C. T.; et al. Eosinophilic esophagitis in 29 pediatric patients. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 2, p. 141-146, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032008000200010>.

FOGG, M. I.; RUCHELLI, E.; SPERGEL, J. M. Pollen and eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 4, p. 796-7, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(03\)01715-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(03)01715-9)

FRANCIOSI, J. P.; et al. Development of a validated patient-reported symptom metric for pediatric eosinophilic esophagitis: qualitative methods. **BMC Gastroenterol**, n. 11, p. 126, 2011. doi: 10.1186/1471-230X-11-126.

FRANCIOSI J. P.; et al. Quality of life in paediatric eosinophilic esophagitis: what is important to patients? **Child Care Health Dev**, v. 38, n. 4, p. 477-83, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2214.2011.01265.x.

FURUSE, M.; et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **J Cell Biol**, v. 156, n. 6, p. 1099-1111, 2002. DOI:10.1083/jcb.200110122

FURUTA, G. T.; et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342-1363, 2007. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.08.017

GONÇALVES, L. O.; et al. Incidence of Childhood Eosinophilic Esophagitis in Central Brazil: How Many Are We Missing? **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 28, n. 4, p. 241-245, 2018. doi: 10.18176/jiaci.0241.

GREUTER, T.; et al. Diagnostic and therapeutic long-term management of eosinophilic esophagitis-current concepts and prospectives for steroid use. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 9, n. 12, p. 212, 2018. DOI: 10.1038/s41424-018-0074-8

GRUNWALD, G. B. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, n. 5, p. 797-805, 1993.  
[https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90028-O](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90028-O)

GUTIERREZ-JUNQUEIRA, C.; et al. High Nutr of relevance response to proton-pump inhibitor treatment in children with esophageal eosinophilia. **J Pediatr Gastroenterol**, v. 62, n. 5, p. 704-710, 2016. doi: 10.1097/MPG.0000000000001019

HARTSOCK, A.; NELSON, W. J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 3, p. 660-669, 2008. DOI:10.1016/j.bbamem.2007.07.012

HIRANO, I.; et al. Endoscopic assessment of the oesophageal features of eosinophilic oesophagitis: validation of a novel classification and grading system. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 489-495, 2013. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301817

HOLLWARTH, M. E.; et al. Esophageal blood flow in the cat. Normal distribution and effects of acid perfusion. **Gastroenterology**, v. 90, n. 3, p. 622-627, 1986. PMID: 3943693

HURREL, J. M.; GENTA, R. M.; DELLON, E. S. Prevalence of esophageal eosinophilia varies by climate zone in the United States. **Am J Gastroenterol**, v. 107, n. 5, p. 698-706, 2012. doi: 10.1038/ajg.2012.6.

JENSEN, E. T.; et al. Early Life Exposures as Risk Factors for Pediatric Eosinophilic Esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 57, n. 1, p. 67-71, 2013. DOI: 10.1097/MPG.0b013e318290d15a

JENSEN, E. T. et al. Esophageal eosinophilia is increased in rural areas with low population density: Results from a national pathology database. **J Gastroenterol**, v. 109, n. 5, p. 668-675, 2014. doi: 10.1038/ajg.2014.47.

JENSEN, E. T. et al. Prenatal, intrapartum, and postnatal factors are associated with pediatric eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 141, n. 1, p. 214-222, 2018. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.018.

JOHNSON, L. F.; DEMEESTER, T. R.; HAGGITT, R. C. Esophageal epithelial response to gastroesophageal reflux. A quantitative study. **Dig Dis Sci**, v. 23, n. 6, p. 498-509, 1978. PMID: 27983

JOHNSSON, M.; et al. Distinctive blood eosinophilic phenotypes and cytokine patterns in eosinophilic esophagitis, inflammatory bowel disease and airway allergy. **J Innate Immun**, v. 3, n. 6, p. 594-604, 2011. doi: 10.1159/000331326.

KAGALWALLA, A. F.; et al. Effect of six-food elimination diet on clinical and histologic outcomes in eosinophilic esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 9, p. 1097-102, 2006. DOI: 10.1016/j.cgh.2006.05.026

KAHN, J.; et al. Exercise-induced Chest Pain: An Atypical Manifestation of Eosinophilic Esophagitis. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 2, p. 196-199, 2015. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.08.007

KAPEL, R. C.; et al. Eosinophilic esophagitis: a prevalent disease in the United States that affects all age groups. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1316-21, 2008. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.016.

KASSABIAN, S.; et al. Eosinophilic esophagitis in patients with esophageal atresia and chronic dysphagia. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 47, p. 18038-18043, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.18038

KATZKA, D. A.; et al. Effects of topical steroids on tight junction proteins and spongiosis in esophageal epithelia of patients with eosinophilic esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 11, p. 1824-9, 2014. doi: 10.1016/j.cgh.2014.02.039.

KATZKA, D. A.; et al. Endoscopic Mucosal Impedance Measurements Correlate With Eosinophilia and Dilation of Intercellular Spaces in Patients With Eosinophilic Esophagitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 7, p. 1242-1248, 2015.

KELLY, K. J. et al. Eosinophilic esophagitis attributed to gastroesophageal reflux: improvement with an amino acid-based formula. **Gastroenterology**, v. 109, n. 5, p. 1503-12, 1995. PMID: 7557132

KIM, H. P. et al. The prevalence and diagnostic utility of endoscopic features of eosinophilic esophagitis: a meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 9, p. 988-996, 2012. doi:

10.1016/j.cgh.2012.04.019.

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. PMID: 648822

LECKBAND, D.; PRAKASAM, A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 259-287, 2006. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095753

LEE, R. G. Marked eosinophilia in esophageal mucosal biopsies. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 9, n.7, p. 475-79, 1985. PMID: 4091182

LIACOURAS, C. A.; et al. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 12, p. 1198-1206, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00885-2](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00885-2)

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. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.040.

LIACOURAS, C. A.; SPERGEL, J.; GOBER, L. M. Eosinophilic esophagitis: clinical presentation in children. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 43, n. 2, p. 219- 229, 2014. doi: 10.1016/j.gtc.2014.02.012.

LIU, Y.; et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. **J Cell Sci**, v. 113, p. 2363-2374, 2000. PMID: 10852816

LUCENDO, A. J.; MOLINA-INFANTE, J. Efficacy of proton pump inhibitor drugs for inducing clinical and histological remission in patients with symptomatic esophageal eosinophilia: a systematic review and meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 1, p. 13-22, 2016. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.041.

LUCENDO, A. J.; et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. **United European Gastroenterology Journal**, v. 5, n. 3, p. 335-58, 2017. doi: 10.1177/2050640616689525.

MAVI, P.; et al. Esophageal functional impairments in experimental eosinophilic esophagitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 11, p. G1347-G1355, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00013.2012>

MISHRA, A.; et al. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. **J Clin Invest**, v. 107, n. 1, p. 83-90, 2001. DOI: 10.1172/JCI10224

MOAWAD, F. J.; et al. Randomized controlled trial comparing aerosolized swallowed fluticasone to esomeprazole for esophageal eosinophilia. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 3, p. 366-72, 2013a. doi: 10.1038/ajg.2012.443.

MOAWAD, F. J.; CHEATHAM, J. G.; DEZEE, K. J. Meta-analysis: the safety and efficacy of dilation in eosinophilic oesophagitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 38, n. 7, p. 713-720, 2013b. doi: 10.1111/apt.12438.

MOLINA-INFANTE, J.; et al. The role of proton pump inhibitor therapy in the management of eosinophilic esophagitis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 12, n. 9, p. 945-952, 2016. doi: 10.1080/1744666X.2016.1178574.

MOLINA-INFANTE, J; LUCENDO, A. J. Proton Pump Inhibitor Therapy for Eosinophilic Esophagitis: A Paradigm Shift. **Am J Gastroenterol**, v. 112, n. 12, p. 1770-1773, 2017. doi: 10.1038/ajg.2017.404.

MUELLER, S.; et al. Comparison of histological parameters for the diagnosis of eosinophilic oesophagitis versus gastro-oesophageal reflux disease on oesophageal biopsy material. **Histopathology**, v. 53, n. 6, p. 676-684, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03187.x.

MURALI, A. R.; et al. Topical steroids in eosinophilic esophagitis: Systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized clinical trials. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 31, n. 6, p. 1111-9, 2016. doi: 10.1111/jgh.13281.

O'SHEA, K. M.; et al. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, v. 154, n. 2, p. 333-345, 2018. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.065.

OKIMOTO, K.; et al. A Prospective Study of Eosinophilic Esophagitis and the Expression of Tight Junction Proteins in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease Symptoms. **Gut and Liver**, v. 12, n. 1, p. 30-37, 2018. doi: 10.5009/gnl16600.

ORENSTEIN, S. R.; et al. The spectrum of pediatric eosinophilic esophagitis beyond infancy: a clinical series of 30 children. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 6, p. 1422-1430, 2000. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.02073.x

OTTESON, T. D.; et al. The otolaryngologic manifestations in children with eosinophilic esophagitis. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 76, n. 1, p. 116–119, 2012. doi: 10.1016/j.ijporl.2011.10.015.

PESEK, R. D.; GUPTA, S. K. Emerging drugs for eosinophilic esophagitis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 23, n. 2, p. 173-183, 2018. doi: 10.1080/14728214.2018.1483335

PETERSON, K. A.; et al. Elemental diet induces histologic response in adults with eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 108, n. 5, p. 759-766, 2013. doi: 10.1038/ajg.2012.468.

POKUTTA, S.; WEIS, W. I. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 237-261, 2007. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104241

RADONJIC-HOSLI, S.; SIMON, H. U. Eosinophils. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 100, p. 193–204, 2014. DOI: 000358735.

RAMIREZ, G. A.; et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. **BioMed Research International**, v. 28, 2018. doi: 10.1155/2018/9095275

REZENDE, E. R. M. A.; et al. Clinical characteristics and sensitivity to food and inhalants among children with eosinophilic esophagitis. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 47, 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-47.

RICHTER, J. E. Endoscopic treatment of Eosinophilic Esophagitis. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 28, n. 1, p. 97, 2018. DOI: 10.1016/j.giec.2017.07.009

ROBSON, J.; et al. Incidence and Prevalence of Pediatric Eosinophilic Esophagitis in Utah Based on a 5-Year Population-Based Study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 1, p. 107–114, 2019. doi: 10.1016/j.cgh.2018.06.028.

ROCHMAN, M.; AZOUZ, N. P.; ROTHEMBERG, M. E. Epithelial origin of eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 142, n. 1, p. 10-23, 2018. doi: 10.1016/j.jaci.2018.05.008.

ROSENBERG, C. E.; et al. Esophageal IgG4 levels correlate with histopathologic and transcriptomic features in eosinophilic esophagitis. **Allergy**, v. 73, n. 9, p. 1892-1901, 2018. doi: 10.1111/all.13486.

ROTHENBERG, M. E.; et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. **Nat Genet**, v. 42, n. 4, p. 289-91, 2010. doi: 10.1038/ng.547.

RUBINSTEIN, E.; et al. Siglec-F inhibition reduces esophageal eosinophilia and angiogenesis in a mouse model of eosinophilic esophagitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 53, n. 4, p. 409-16, 2011. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182182ff8.

RUBINSTEIN, E.; ROSEN, R. L. Respiratory symptoms associated with eosinophilic esophagitis. **Pediatric Pulmonology**, v. 53, n. 11, p. 1587-1591, 2018. doi: 10.1002/ppul.24168.

SANTOS, M. F. O.; et al. Translation and cultural adaptation of the Pediatric Eosinophilic Esophagitis Symptom Score (PEESS v2.0). **J Ped (Rio J)**, v. 94, n. 6, p. 642-651, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2017.09.004>.

SCHLEIMER, R.; BERDNIKOVS, S. Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 139, n.6, p. 1752-61, 2017. doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.010.

SCHOEPFER, A. M.; STRAUMANN, A. Pharmacologic treatment of Eosinophilic Esophagitis. **Gastrointest Endoscopy Clin N Am**, v. 28, n. 1, p. 77-88, 2018. doi: 10.1016/j.giec.2017.07.007.

SHERRILL, J. D.; et al. Variants of thymic stromal lymphopoitin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 1, p. 160-5, 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.037.

SHERRILL, J. D.; ROTENBERG, M. E. Genetic dissection of eosinophilic esophagitis provides insight into disease pathogenesis and treatment strategies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 1, p. 23-32, 2011. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.03.046

SHODA, T.; et al. Eosinophilic esophagitis versus proton pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia: transcriptome analysis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 139, n. 6, p. 2010-2013, 2017. doi: 10.1016/j.jaci.2016.11.028.

SINGLA, M. B.; et al. Early comparison of inflammatory vs. fibrostenotic phenotype in eosinophilic esophagitis in a multicenter longitudinal study. **Clin. Tranl. Gastroenterol**, v. 6, e132, 2015. DOI: 10.1038/ctg.2015.62

SPERGEL, J.; et al. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 109, n. 2, p. 363-368, 2002.  
<https://doi.org/10.1067/mai.2002.121458>

SPERGEL, J.; et al. Variation in prevalence, diagnostic criteria, and initial management options for eosinophilicgastrointestinal diseases in the United States. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 52, n. 3, p. 300-6, 2011. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181eb5a9f

STEIN, M. L.; et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 118, n. 6, p. 1312-9, 2006. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.09.007

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, n. 5, p. 506-509, 2006. DOI: 10.1097/01.mpg.0000221906.06899.1b

STRAUMANN A.; et al. Idiopathic eosinophilic esophagitis: a frequently overlooked disease with typical clinical aspects and discrete endoscopic findings. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 124, n. 33, p. 1419-1429, 1994. PMID: 7939509

STRAUMANN A.; et al. Natural history of primary eosinophilic esophagitis: a follow-up of 30 adult patients for up to 11.5 years. **Gastroenterol**, v. 125, n. 6, p. 1660- 1669, 2003.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.024>

STRAUMANN A.; et al. Pediatric and adult eosinophilic esophagitis: similarities and differences. **Allergy**, v. 67, n. 4, p. 477-490, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.03278.x.

STRAUMANN A.; et al. Anti eosinophil activity and clinical efficacy o the CRTH2 antagonist OC000459 in eosinophilic esophagitis. **Allergy**, v. 68, n. 3, p. 375-85, 2013. doi: 10.1111/all.12096.

WOLF, W. A.; JERATH, M. R.; DELLOM, E. S. De-novo onset of eosinophilic esophagitis after large volume allergen exposures. **J Gastrointest Liver Dis**, v. 22, n. 2, p. 205-8, 2013. PMCID: PMC3813013

## ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – (Microscopia 40X-4): Coloração hematoxilina-eosina: (A) alongamento de papilas, (B) hiperplasia da camada basal, (C) espongiose, (D) microabcessos eosinofílicos em pacientes com EoE.

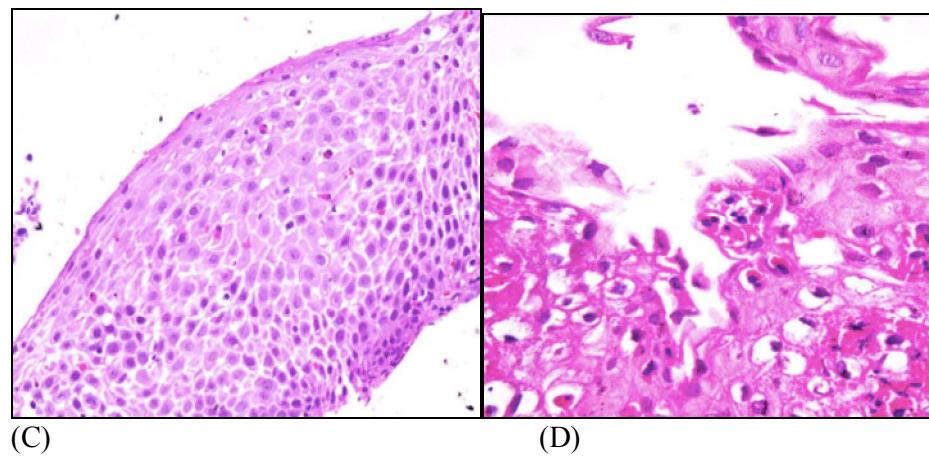
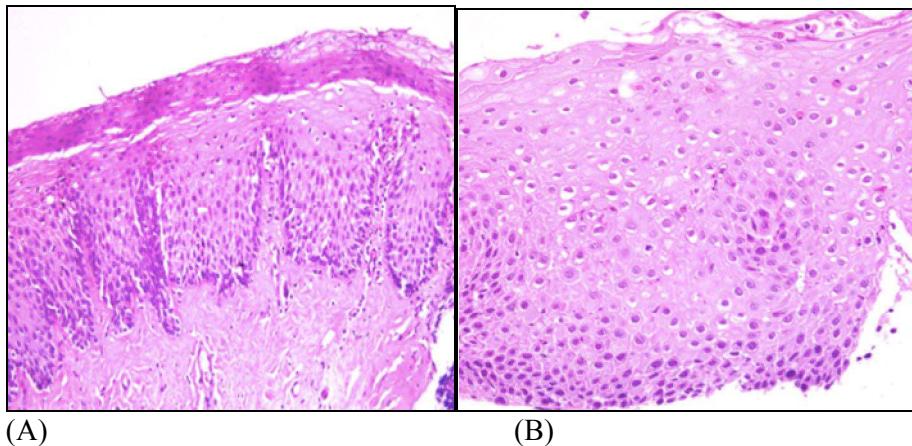


Figura 2 – E-caderina (40X-normal): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando expressão positiva em toda espessura do epitélio mucoso em paciente controle.

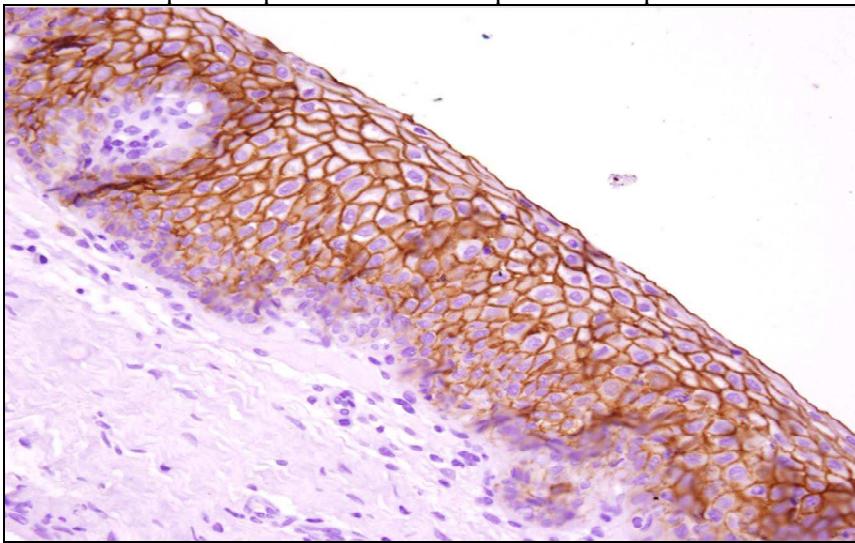


Figura 3 – (E-caderina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para E-caderina mostrando grandes áreas de expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente com EoE.

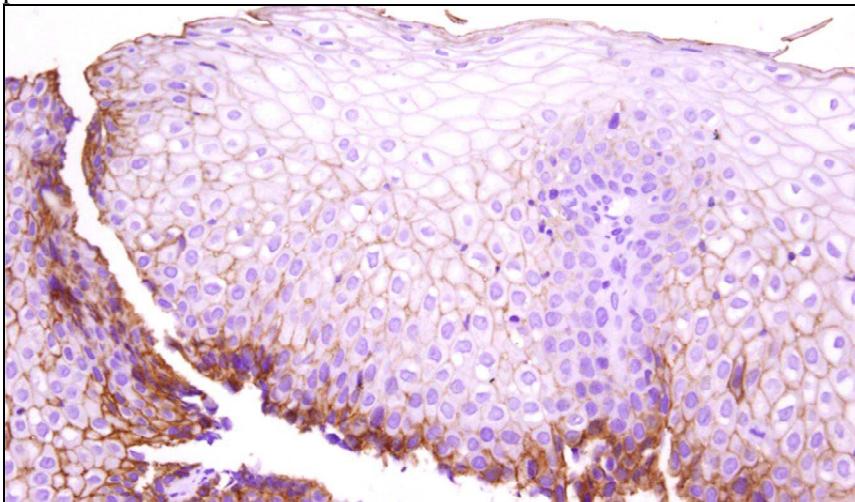


Figura 4 – (Filagrina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para filagrina mostrando expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente com EoE.

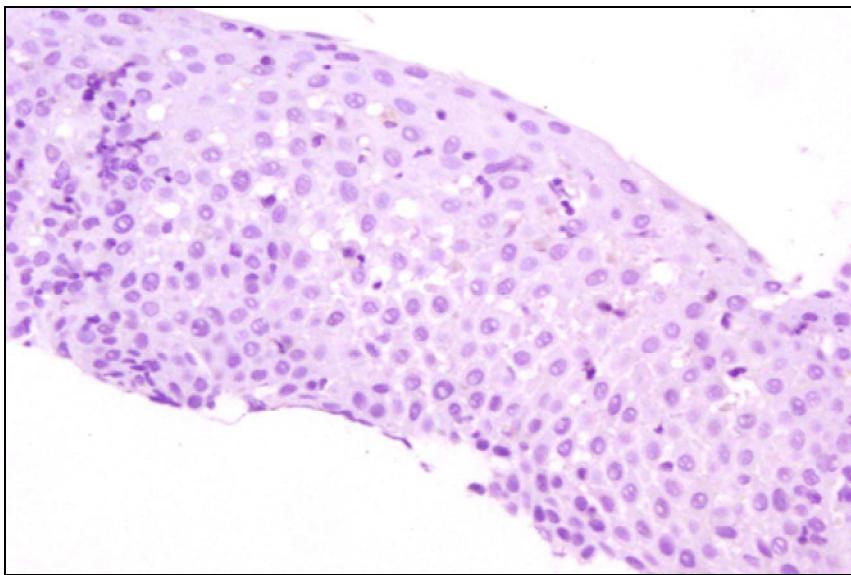


Figura 5 – (Filagrina 40X-4): Coloração Imuno-histoquímica para filagrina mostrando expressão negativa, principalmente nos dois terços superiores da mucosa em paciente controle.

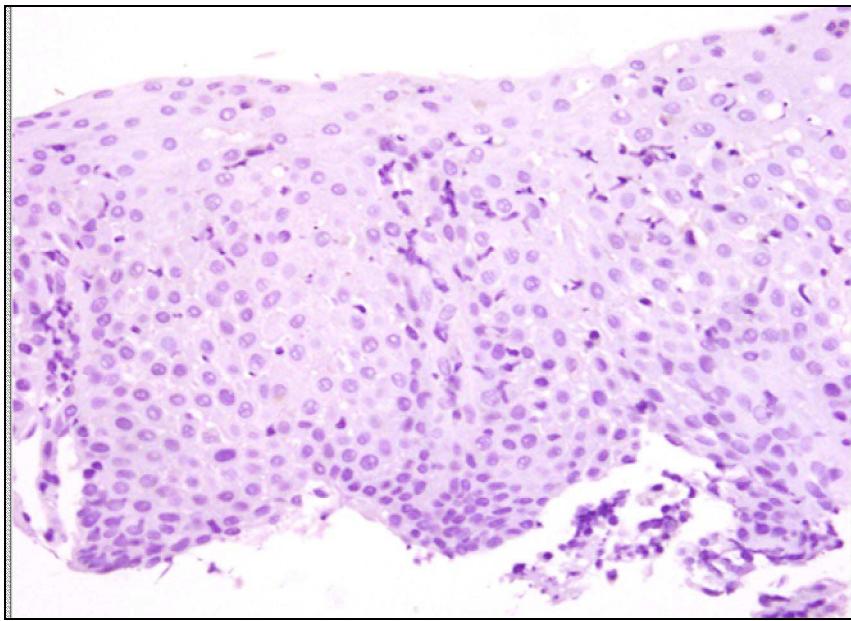
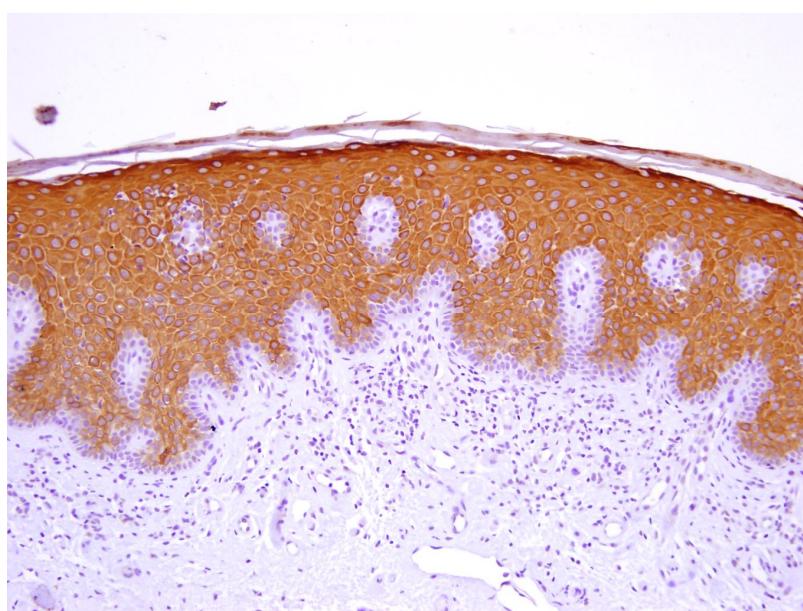
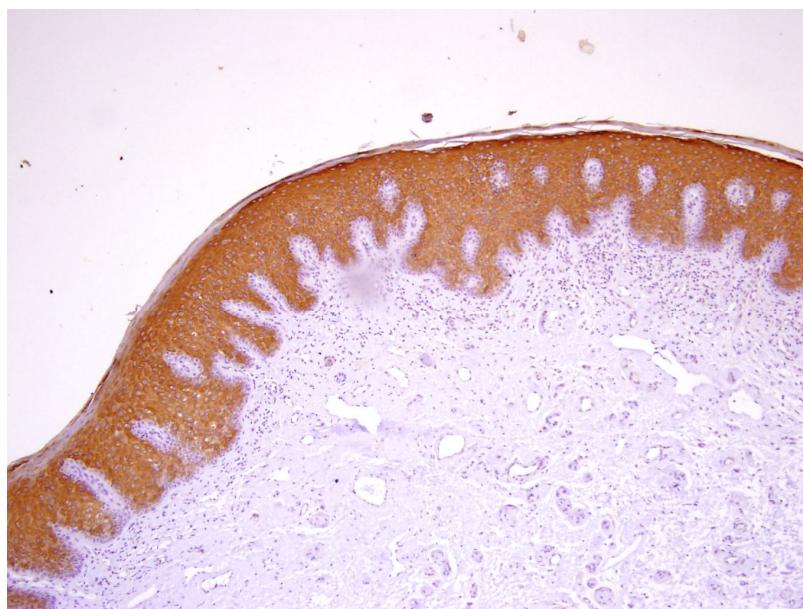


Figura 6 – (Filagrina 40X-4): Fotomicrografia de controle positivo da filagrina na pele, mostrando expressão esperada nas camadas espinhosa e córnea.



## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pais ou responsáveis**

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, ..... de .....de

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**

### **Termo de Assentimento**

#### **(12 anos a 17 anos e 29 dias)**

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, ..... de .....de 20 .....

---

Assinatura dos pesquisadores

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

Participante da pesquisa

## APÊNDICE C – ANÁLISE DE PRONTUÁRIO

### **Análise de prontuário**

Paciente número: ..... Data: .....

1. Sexo

Feminino

Masculino

2. Idade (meses): .....

3. Tempo de sintomas até o diagnóstico (meses): .....

4. Sintomas atuais

Dor abdominal

Vômitos

Epigastralgia

Disfagia

Impactação

Emagrecimento

Assintomático

5. Tempo de diagnóstico (meses): .....

6. Presença de Atopia:

Nega história de Atopia

Asma

Rinite

Dermatite Atópica

Urticária

Alergia Alimentar (especificar o alimento)

IgE mediada

Não IgE mediada

7. Tempo de tratamento (meses): .....

Corticóide inalatório deglutido (dose): .....

Budesonida viscosa (dose):

Inibidor de bomba de prótons (dose):.....

Outro medicamento: .....

## 8. Dieta de exclusão

Sim (tempo em meses e alimentos excluídos) .....

Não

## Análise de prontuário

Paciente número: .....

1) Achados endoscópicos ao diagnóstico:

- Espessamento de mucosa
- Opacificação
- Secreção brancacenta aderida
- Linhas verticais
- Anéis verticais
- Traqueilização
- Hiperemia
- Erosão
- Normal

2) Achados histológicos ao diagnóstico:

Eosinófilos (número): .....

- Granuloma eosinofílico
- Hiperplasia da camada basal
- Alongamento de papilas
- Espongiose

3) Presença de atopia

- Não
- Asma
- Rinite
- Urticária
- Dermatite Atópica
- Alergia Alimentar
- IgE mediada (listar os alimentos)
- Não IgE mediada (listar os alimentos)

**APÊNDICE D – ANÁLISE HISTOLÓGICA****Análise histológica**

Paciente número: .....

- a. Eosinófilos presentes?  Não  
 Sim

Qual o número máximo? \_\_\_\_\_ / campo microscópico de grande aumento

- b. Presença de alongamento das papilas dérmicas?  Não  
 Sim

- c. Hiperplasia de células da camada basal presente?  Não  
 Sim.

- d. Aumento do espaçamento intercelular?  Não  
 Sim. Qual intensidade?

- e. Microabscessos de eosinófilos presentes?  Não  
 Sim

**Análise imuno-histoquímica**

- f. Expressão de E - caderina?  Não  
 Sim

- g. Expressão de Filagrina?  Não  
 Sim

## 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-UFG, 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

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 Catiônica 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; SCHARAIMNAM; 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

Continuação do Parecer: 887.499

et al., 2011; PAPADOPOLOU et al., 2014). A EEO 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 EEO já foi revisada em algumas publicações (GUPTA S.K., 2008). Os dados obtidos em indivíduos com EEO 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 EEO 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 (EEO) 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 (EEO) 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)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br

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 EEO 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 EEO 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 EEO 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 EEO submetidos ao exame de EDA. g. Analisar a expressão de CD1a na mucosa esofágica dos pacientes com diagnóstico de EEO 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 EEO 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 EEO 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:** UBERLANDIA

**Telefone:** (34)3239-4131

**Fax:** (34)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br

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:**

Nenhuma.

**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 Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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 2017.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: dezembro de 2018.

**OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

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:** UBERLANDIA

**Telefone:** (34)3239-4131

**Fax:** (34)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br

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).

UBERLANDIA, 26 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
**(Coordenador)**

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