

# Avaliação da expressão da filagrina em biópsias esofágicas de pacientes com esofagite eosinofílica

*Evaluation of filaggrin expression in esophageal biopsies of patients with eosinophilic esophagitis*

Fernando Monteiro Aarestrup<sup>1</sup>, Klaus Ruback Bertges<sup>2</sup>, Alvaro Dutra Presto<sup>1</sup>,  
Laetitia Alves Cinsa<sup>1</sup>, Luiz Carlos Bertges<sup>2</sup>, Matheus Fonseca Aarestrup<sup>3</sup>,  
Paula Fonseca Aarestrup<sup>4</sup>, Thais Abranches Bertges<sup>2</sup>, Beatriz Julião Vieira Aarestrup<sup>5</sup>

## RESUMO

**Introdução:** Mutações do gene da filagrina vêm sendo associadas, classicamente, a alterações da barreira epitelial em doenças alérgicas com comprometimento da pele e das superfícies mucosas. Particularmente na dermatite atópica, a relação entre filagrina, mecanismo fisiopatológico e evolução clínica tem sido demonstrada. Recentemente, alterações da barreira epitelial com redução da expressão da filagrina, também têm sido associadas a mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da esofagite eosinofílica. Devido a disfunções na barreira epitelial, microrganismos e alérgenos são capazes de penetrarem no epitélio da mucosa esofágica, assim como na dermatite atópica.

**Objetivo:** Avaliar a possível correlação da expressão da filagrina com os achados histopatológicos em biópsias esofágicas de pacientes com esofagite eosinofílica. **Métodos:** A expressão da filagrina foi investigada *in situ*, por imuno-histoquímica, em biópsias esofágicas nos seguintes grupos: Grupo I, controle (n=8), amostras provenientes de pacientes saudáveis; Grupo II (n=27), amostras provenientes de pacientes com esofagite eosinofílica.

**Resultados:** Os resultados demonstraram uma diminuição da expressão da filagrina na mucosa do esôfago de portadores de esofagite eosinofílica. Adicionalmente, a intensidade da marcação imuno-histoquímica foi menor na mucosa esofágica com maior infiltração de eosinófilos. **Conclusão:** A diminuição da expressão de filagrina pode ser um fenômeno fisiopatológico associado ao aumento da quantidade de eosinófilos na mucosa esofágica, podendo impactar na evolução clínica da esofagite eosinofílica.

**Descritores:** Esofagite eosinofílica, imuno-histoquímica, mucosa esofágica, dermatite atópica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Filaggrin gene mutations have been classically associated with changes in the epithelial barrier in allergic diseases involving the skin and mucosal surfaces. Particularly in atopic dermatitis, the relationship between filaggrin, pathophysiological mechanism and clinical evolution has been demonstrated. Recently, changes in the epithelial barrier with reduced expression of filaggrin have also been associated with immunological mechanisms involved in the pathogenesis of eosinophilic esophagitis. Due to dysfunction in the epithelial barrier, microorganisms and allergens are able to penetrate the epithelium of the esophageal mucosa, as well as in atopic dermatitis. **Objective:** To evaluate the possible correlation of filaggrin expression with histopathological findings in esophageal biopsies of patients with eosinophilic esophagitis. **Methods:** Filaggrin expression was investigated *in situ* by immunohistochemistry in esophageal biopsies in the following groups: Group I, control (n = 8), samples from healthy patients; Group II (n = 27), samples from patients with eosinophilic esophagitis. **Results:** The results demonstrated a decrease in the expression of filaggrin in the esophageal mucosa of patients with eosinophilic esophagitis. Additionally, the intensity of the immunohistochemical labeling was lower in the esophageal mucosa with greater infiltration of eosinophils. **Conclusion:** The reduction of filaggrin expression may be a pathophysiological phenomenon associated with an increase in the quantity of eosinophils in the esophageal mucosa, which may impact on the clinical evolution of eosinophilic esophagitis.

**Keywords:** Eosinophilic esophagitis, immunohistochemistry, esophageal mucosa, atopic dermatitis.

1. Universidade Federal de Juiz de Fora, CBR, Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental - Juiz de Fora, MG, Brasil.
2. Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde - SUPREMA e Hospital Maternidade Therezinha de Jesus - Juiz de Fora, MG, Brasil.
3. Instituto de Ensino Superior Tancredo Neves (IPTAN), Faculdade de Medicina - São João Del Rei, MG, Brasil.
4. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Faculdade de Medicina - Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
5. Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Morfologia - Histologia - Juiz de Fora, MG, Brasil.

Submetido em: 22/11/2021, aceito em: 18/12/2021.

Arq Asma Alerg Imunol. 2022;6(1):116-21.

## Introdução

A esofagite eosinofílica (EoE) vem sendo estudada desde o final da década de 70 e foi melhor descrita em 1993 por Attwood e cols. Trata-se de uma doença inflamatória crônica, imuno-antígeno mediada, caracterizada pela inflamação eosinofílica localizada no esôfago, sem envolvimento de outras partes do trato gastrointestinal (TGI), associada aos sintomas de disfunção esofágica, como a disfagia, náuseas, vômitos e impactação alimentar<sup>1-2</sup>. A EoE é mais frequente em pacientes com história pessoal e/ou familiar de atopias, como alergia alimentar, asma e rinite alérgica. Sobre a prevalência, estudos epidemiológicos indicam que EoE é tão prevalente quanto as doenças inflamatórias intestinais idiopáticas, podendo afetar de 40 a 55 indivíduos/100.000 habitantes<sup>3</sup>. Entretanto, como a EoE só foi reconhecida e caracterizada como uma entidade isolada nos últimos anos, provavelmente, muitos pacientes já foram erroneamente diagnosticados como portadores de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE)<sup>2-4</sup>.

O diagnóstico histopatológico obtido a partir do material das biópsias do esôfago é definido pela presença de 15 ou mais eosinófilos (Eo) por campo de maior aumento (400X). Para definição diagnóstica, é recomendada a análise de 2 a 4 amostras de dois segmentos diferentes do esôfago, independente do aspecto de normalidade na endoscopia digestiva alta (EDA)<sup>2,4</sup>. A sensibilidade diagnóstica do exame histopatológico pode chegar a 100%, quando no mínimo cinco amostras de biópsias esofágicas são coletadas<sup>3</sup>. Na circulação sanguínea periférica, a eosinofilia é encontrada, em média, em 50% dos pacientes portadores de EoE<sup>5</sup>.

Mutações do gene da filagrina (FLG) têm sido associadas a alterações da barreira epitelial em doenças alérgicas que afetam a pele e as superfícies mucosas, como dermatite atópica e asma<sup>6-11</sup>. A disfunção da barreira epitelial representada principalmente pela redução da expressão da FLG interage intimamente com os mecanismos imunológicos envolvidos na fisiopatologia destas doenças atópicas. Do mesmo modo, na EoE, a disfunção da barreira epitelial na mucosa esofágica comprometida parece, também, ser um fator chave na fisiopatologia. Mais recentemente, a expressão anormal de filagrina tem sido sugerida como possível via de atuação no mecanismo fisiopatológico da EoE<sup>12-14</sup>.

Devido a uma barreira epitelial alterada, microrganismos e alérgenos são capazes de penetrar no

epitélio da mucosa esofágica. Estes antígenos são reconhecidos por células epiteliais através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que então liberam citocinas, como linfopoetina estromal tímica (TSLP), iniciando uma resposta imunológica de perfil Th2. Em consequência da resposta Th2 os eosinófilos são recrutados da circulação, principalmente pela produção local esofágica de IL-5 e eotaxina<sup>9-13</sup>.

No presente estudo, a expressão *in situ* da FLG foi investigada em biópsias esofágicas de pacientes com EoE. Os resultados sugeriram que a expressão da FLG no epitélio da mucosa do esôfago é inversamente proporcional à quantidade de eosinófilos observados na mucosa esofágica.

## Material e métodos

### Pacientes

A amostra inicial do estudo compreendeu 50 pacientes adultos (N = 50), de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com suspeita clínica de esofagite eosinofílica. O diagnóstico definitivo foi realizado baseado em características clínicas e endoscópicas sugestivas de EoE, associadas à presença de pelo menos 15 eosinófilos (EO) por campo microscópico de maior aumento (400X) na mucosa esofágica; o diagnóstico foi confirmado por análise histopatológica em 27 pacientes (n = 27), tendo sido realizadas no mínimo seis biópsias em regiões diferentes do esôfago. As biópsias esofágicas foram realizadas com finalidade diagnóstica antes de iniciado o tratamento dos pacientes.

Com a finalidade de controle do estudo, foram analisadas amostras esofágicas provenientes de pacientes saudáveis, compondo o grupo controle (Grupo I, n = 8). As amostras de biópsias esofágicas provenientes dos pacientes com EoE compuseram o Grupo II (n = 27). Todas as amostras dos grupos I e II foram submetidas a análise histopatológica e imuno-histoquímica.

Este estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial de princípios éticos para pesquisa médica envolvendo seres humanos, e aprovado por Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Parecer 2.314.988 / CAAE 28260814.9.0000.5103 SUPREMA - Sociedade Universitária para Ensino Médico).

### Processamento histopatológico

As biópsias do esôfago foram obtidas a partir de porções proximal, medial e distal em todos os pacientes incluídos no estudo. As amostras foram fixadas em formol a 10%, incluídas em bloco de parafina e submetidas à microtomia com cortes histológicos com 5 a 6 µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina para exame de rotina. As amostras foram examinadas com um microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), por dois observadores independentes com formação em histopatologia. Após a observação, foram selecionadas áreas representativas da mucosa esofágica para análise histopatológica descritiva em campo microscópico de maior aumento (aumento de 400x), e três áreas representativas foram escolhidas para captura fotográfica digital. A contagem de eosinófilos foi investigada a partir da área mais representativa com maior densidade de eosinófilos.

### Detecção in situ da FLG por imunohistoquímica

O método de imunohistoquímica para detecção da expressão de FLG envolveu as seguintes etapas: desparafinização por 20 min (60 °C) e embebição em 3 banhos de xilol por 3 min cada; hidratação em álcool 100%, 95% e 70% por 3 min em cada; enxague em água destilada; bloqueio da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 0,4% por 30 min /100 µL por corte); recuperação antigênica em banho-maria a 95 °C por 40 min, em PBS; resfriar por 20 min em temperatura ambiente e enxague com PBS por 1 min; adição de 4 gotas de

Background Sniper sobre o corte e incubação por 15 min (temperatura ambiente); enxague em tampão PBS (1 min). Os cortes preparados foram incubados com o anticorpo primário Anti-Filagrina (Santa Cruz, Inc.) (Diluição 1:100 µL) por 1 h. Após, enxágue duplo em PBS (2 min); gotejamento do anticorpo secundário Link Universal Trekkie sobre o corte e incubação por 20 min (temperatura ambiente); enxague duplo em PBS (2 min); incubação em câmara úmida, por 10 min com TrekAvidin- HRP (Label): estreptavidina (temperatura ambiente); enxágue duplo em PBS (2 min cada); incubação com cromógeno Betazoid DAB Chromogen (DAB) homogeneizado em 1 mL de PBS (5 min); enxágue duplo em água destilada e em PBS; contracoloração com hematoxilina (1 min); enxágue duplo em água destilada e posteriormente em PBS (1 min cada); desidratação em três banhos de álcool 100% (1 min cada) e seguido por três banhos em xilol (1 min cada); montagem das lâminas. O controle negativo foi realizado omitindo-se, em corte selecionado, o anticorpo primário. A positividade foi determinada pela observação, em microscopia óptica, de coloração castanha intracitoplasmática.

A marcação imunohistoquímica positiva para FLG no epitélio da mucosa esofágica foi avaliada de acordo com a imunorreatividade e intensidade, e classificada de acordo com os critérios de escore<sup>14</sup>. Os resultados foram expressos em média do escore por grupo de estudo. Os critérios definidores de intensidade de expressão e imunorreatividade estão especificados na Tabela 1. Todas as análises foram realizadas por dois diferentes examinadores.

**Tabela 1**

Critérios de avaliação da reação imunohistoquímica para filagrina<sup>14</sup>

#### Intensidade da expressão

- 0 Sem marcação positiva
- 1 Fraca
- 2 Moderada
- 3 Intensa

#### Imunorreatividade

- 0 Ausência de positividade
- 1 Positividade em mais de 10% das células (campo microscópico 400x)
- 2 Positividade em 10 a 50% das células (campo microscópico 400x)
- 3 Positividade em mais de 50% das células (campo microscópico 400x)

### Análise estatística

Para a comparação entre as variáveis dos dois grupos foi utilizado o teste *t* de Student. Foi utilizado o *software* SPSS 22. O nível de significância foi considerado para  $p < 0,05$ .

### Resultados

A análise imuno-histoquímica revelou uma redução ( $p < 0,05$ ) no número de células marcadas positivamente para filagrina na comparação entre as amostras do grupo controle (escore 3) e as amostras dos pacientes com EoE (escore 1). A Tabela 2 demonstra a imunorreatividade no grupo controle e no Grupo EoE.

Com relação à intensidade da marcação imuno-histoquímica, as amostras do grupo I (controle) apresentaram-se fortemente coradas (escore 3). A diminuição da intensidade da marcação foi observada nas amostras do grupo II (EoE). Entretanto, os resultados demonstraram que quanto maior o número de eosinófilos por campo microscópico (aumento de 400x), menor foi a intensidade da marcação imuno-histoquímica para filagrina.

Desse modo, para fins comparativos dividimos as amostras esofágicas de pacientes com EoE em dois subgrupos com o ponto de corte de 25 eosinófilos por campo microscópico por haver uma correlação entre

esta quantidade de eosinófilos com uma significativa diminuição da intensidade da marcação tecidual da filagrina ( $p < 0,05$ ).

A Figura 1 apresenta os resultados do escore da intensidade da marcação respectivamente em cada grupo.

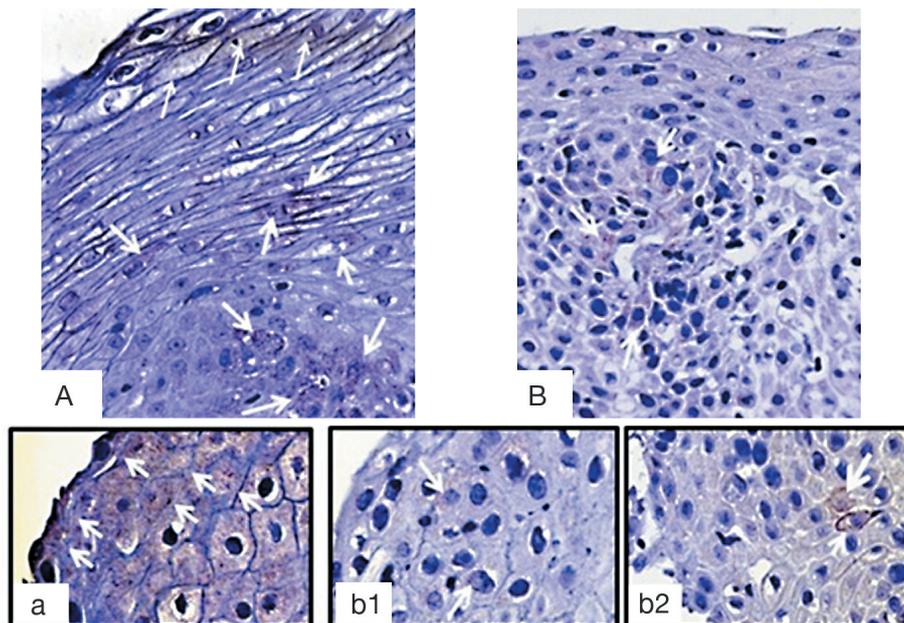
### Discussão

A FLG é uma proteína estrutural da pele e a perda da sua função está associada com a permeabilidade cutânea e susceptibilidade para o desenvolvimento de dermatite atópica e, nos pacientes com EoE, tem influência na permeabilidade da barreira epitelial esofágica. Um aspecto importante a ser considerado é que a interleucina-13 (IL-13) contrarregula a expressão de FLG nas células epiteliais, promovendo um mecanismo pelo qual antígenos alimentares ativam a imunidade adaptativa de perfil Th2, o que pode alterar a função de barreira epitelial da mucosa esofágica, talvez propagando o processo inflamatório local e o aumento da absorção antigênica pelas células epiteliais e apresentadoras de antígenos. Desse modo, a FLG influencia no mecanismo de tolerância imunológica que mantém a barreira esofágica íntegra, evitando a passagem de partículas proteicas, que poderiam causar um processo de sensibilização alérgica. A exemplo do que ocorre na dermatite atópica,

**Tabela 2**

Escore de avaliação da marcação imuno-histoquímica: imunorreatividade e intensidade

<b>Imunorreatividade</b>		
A (Grupo 1 - controle)	3	Positividade em mais de 50% das células (campo microscópico 400x)
B (Grupo II - EoE)	1	Positividade em mais de 10% das células (campo microscópico 400x)
<b>Intensidade da expressão</b>		
A (Grupo controle)	3	Intensa
B (Grupo II - EoE) Subgrupos > 25/Eo campo	1	Fraca
B (Grupo II - EoE) Subgrupos > 25/Eo campo	2	Moderada



**Figura 1**

Avaliação imuno-histoquímica da expressão de filagrina em amostras esofágicas. **(A)** presença de inúmeras células positivas (setas), marcadas com o anticorpo anti-filagrina, em amostra do Grupo controle. **(B)** Presença de algumas células (setas) com marcação positiva para filagrina em amostra do Grupo EoE. **(b1)** Intensidade menor da marcação para a filagrina em amostra com número  $\leq 25$  eosinófilos/campo 400x. **(b2)** intensidade menor da marcação para a filagrina em amostra com número  $\geq 25$  eosinófilos/campo 400x

mutações do gene da FLG promovem uma alteração da hidratação tecidual e consequente rompimento da barreira epitelial, facilitando a sensibilização por alérgenos alimentares e/ou aeroalérgenos<sup>12-16</sup>.

Histologicamente, a EOE é caracterizada por um infiltrado inflamatório predominantemente crônico, que inclui eosinófilos, mastócitos, basófilos e células Th2. Semelhante a outras doenças atópicas, a EOE é desencadeada por alimentos alergênicos e aeroalérgenos, culminando em fibrose esofágica ou remodelação tecidual. Como a pele em pacientes com dermatite atópica, o epitélio da mucosa do esôfago apresenta função de barreira alterada em pacientes com EOE<sup>12-16</sup>. No presente estudo, utilizando imuno-histoquímica, demonstramos uma redução acentuada da expressão da FLG no epitélio da mucosa esofágica de pacientes com EoE.

A predisposição genética ao desenvolvimento da EoE está bem documentada. Esta susceptibilidade genética é devida ao polimorfismo de nucleotídeo

único que codifica o gene eotaxina-3 e também por mutações do gene da FLG<sup>14</sup>. O gene eotaxina-3 é considerado o principal promotor do recrutamento de eosinófilos no esôfago, portanto, o aumento da expressão desse gene está relacionado com um fenótipo de EoE caracterizado por intenso infiltrado de eosinófilos.

Recentemente, em cultura de células epiteliais, o aumento da síntese de IL-13 foi associado à alteração na barreira epitelial via diminuição da expressão de filagrina<sup>15</sup>. Anteriormente, Politi e cols. (2017) investigaram, também utilizando imuno-histoquímica, a expressão *in situ* da FLG e da molécula periostina (PET) em biópsias do esôfago de pacientes pediátricos com diagnóstico de EoE. Os autores constataram uma regulação negativa da FLG e regulação positiva da PET na mucosa esofágica de crianças com esofagite eosinofílica, em comparação com biópsias controles obtidas de indivíduos saudáveis. Nossos resultados foram semelhantes aos acima descritos<sup>14</sup>, sendo o

segundo estudo que demonstrou *in situ*, em biópsias humanas, a associação entre EoE e diminuição da expressão da FLG, e o primeiro em amostras provenientes de pacientes adultos.

Quando analisamos o escore da imunorreatividade da filagrina, observamos que as amostras teciduais de pacientes do grupo com EoE apresentaram um escore de marcação positiva para FLG significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o observado nas amostras do grupo controle. Este achado fortalece a hipótese de que alterações da barreira epitelial na EoE são importantes na fisiopatologia desta doença, semelhante ao observado, por exemplo, na dermatite atópica.

Os resultados, com relação à intensidade da marcação para a filagrina, permitem levantar a hipótese de que o número de eosinófilos pode estar influenciando a gravidade da disfunção epitelial via perda de expressão da filagrina. Entretanto, outros estudos são necessários para melhor elucidar o papel da filagrina na patogênese da EoE e no significado da intensidade da infiltração eosinofílica tecidual quanto à evolução clínico-patológica desta doença.

## Referências

- Chehade M, Lucendo AJ, Achem SR, Souza RF. Causes, evaluation, and consequences of eosinophilic esophagitis. *Ann NY Acad Sci*. 2013;1300:110-8.
- Dellon ES, Gonsalves N, Hirano I, Furuta GT, Liacouras CA, Katzka DA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guideline: Evidenced based approach to the diagnosis and management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). *Am J Gastroenterol*. 2013 May;108(5):679-92; quiz 693.
- Chehade M, Sampson HA. Epidemiology and Etiology of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am*. 2008;18:33-44.
- Ferreira CT, Vieira MC, Vieira SM, Silva GS, Yamamoto DR, Silveira TR. Esofagite eosinofílica em 29 pacientes pediátricos. *Arq Gastroenterol*. 2008;45(2):141-6.
- Teitelbaum JE, Fox VL, Twarog FJ, Nurko S, Antonioli D, Gleich G, et al. Eosinophilic esophagitis in children: immunopathological analysis and response to fluticasone propionate. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1216-25.
- Straumann A, Spichtin HP, Grize L, Bucher KA, Beglinger C, Simon HU. Natural history of primary eosinophilic esophagitis: a follow-up of 30 adult patients for up to 11.5 years. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1660-9.
- Straumann A, Conus S, Degen L, Frei C, Bussmann C, Beglinger C, et al. Longterm budesonide maintenance treatment is partially effective for patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9:400-9.e1
- Simon D, Radonjic-Hösli S, Straumann A, Yousefi S, Simon HU. Active eosinophilic esophagitis is characterized by epithelial barrier defects and eosinophil extracellular trap formation. *Allergy*. 2015 Apr;70(4):443-52.
- Valent P, Gleich GJ, Reiter A, Roufosse F, Weller PF, Hellmann A, et al. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol*. 2012 Apr;5(2):157-76.
- Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:S292-302.
- Bochner BS, Gleich GJ. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:16-25.
- Simon D, Radonjic-Hösli S, Straumann A, Yousefi S, Simon HU. Active eosinophilic esophagitis is characterized by epithelial barrier defects and eosinophil extracellular trap formation. *Allergy*. 2015 Apr;70(4):443-52.
- Matoso A, Mikkada VA, Lu S, Monahan R, Cleveland K, Noble L, et al. Expression microarray analysis identifies novel epithelial-derived protein markers in eosinophilic esophagitis. *Mod Pathol*. 2013 May;26(5):665-76.
- Politi E, Angelakopoulou A, Grapsa D, Zande M, Stefanaki K, Panagiotou I, et al. Filaggrin and periostin expression is altered in eosinophilic esophagitis and normalized with treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(1):47-52.
- Wu L, Oshima T, Li M, Tomita T, Fukui H, Watari J, et al. Filaggrin and tight junction proteins are crucial for IL-13-mediated esophageal barrier dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;1;315:G341-50.
- Nagano N, Araki A, Ishikawa N, Nagase M, Adachi K, Ishimura N, et al. Immunohistochemical expression of filaggrin is decreased in proton pump inhibitor nonresponders compared with proton pump inhibitor responders of eosinophilic esophagitis. *Esophagus*. 2021;18:362-71.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Correspondência:  
Fernando Monteiro Aarestrup  
E-mail: fmaarestrup@hotmail.com