MARIANA COLOMBINI ZANIBONI

**Estudo da expressão de filagrina e claudinas 1 e 4 em
indivíduos adultos com dermatite atópica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Aoki

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zaniboni, Mariana Colombini

Estudo da expressão de filagrina e claudinas 1 e 4 em indivíduos adultos com dermatite atópica / Mariana Colombini Zaniboni. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1.Epiderme/fisiopatologia 2.Dermatite atópica 3.Filagrina
4.Claudina-1 5.Claudina-4 6.Imuno-histoquímica 7.Adulto

USP/FM/DBD-105/15

Aos meus pais, Mariley e João Roberto, pelo amor e apoio incondicionais, e por me ensinarem a importância do conhecimento.

À minha irmã, Milena, por sua amizade, carinho e por estar sempre pronta a me oferecer a palavra certa na hora certa.

Aos meus queridos sobrinhos, Julia e Nicolas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Valéria Aoki, pelo apoio, orientação e paciência. Agradeço pela oportunidade e acolhimento. Foi uma honra partilhar de sua sabedoria e receber seus ensinamentos que ultrapassam a vida acadêmica.

À Dra. Raquel Leão Orfali, pela amizade e pela imensa ajuda nas partes mais árduas do meu trabalho.

Ao Dr. Roberto Takaoka pelo carinho e agradável convivência no ambulatório de Dermatite Atópica.

À Naiura Vieira Pereira, do LIM56 por sua atenção, trabalho e paciência e à Fernanda Guedes por compartilhar seus conhecimentos.

Às técnicas do laboratório de Histopatologia, Maria Cristina Galhardo e Jaqueline Maria Cruz Meneghin, pela ajuda inestimável.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva pela paciência e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. José Antônio Sanches Junior, coordenador do curso de Pós-Graduação, pela oportunidade.

Aos funcionários do ambulatório de Dermatologia que me acolheram e se mostraram sempre prontos a ajudar.

Aos pacientes do ambulatório de Dermatite Atópica pela colaboração, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 A barreira cutânea.....	4
1.1.1 Proteínas de relevância funcional da barreira cutânea	5
1.1.1.1 Filagrina	5
1.1.1.2 <i>Tight junctions</i>	8
1.1.1.3 Corneodesmosomas	11
1.1.2 Lipídeos da barreira	13
1.1.3 O pH ácido da camada córnea	15
2 Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	21
3.1 Casuística	21
3.1.1 Critérios de exclusão.....	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Imuno-histoquímica.....	23
3.2.2 Técnica de imuno-histoquímica para a demonstração de claudinas 1 e 4, e filagrina	26
3.2.3 Análise das lâminas	26
3.2.4 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	29
4.1 Análise da expressão de filagrina na DA	29
4.1.1 Expressão da filagrina na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença (EASI), a espessura da epiderme, eosinofilia e IgE sérica.	29
4.1.2 Expressão da filagrina na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão)	30

4.2 Análise da expressão de claudina -1 na DA	31
4.2.1 Expressão da claudina -1 na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença, a espessura da epiderme, a eosinofilia e níveis séricos de IgE.	31
4.2.2 Expressão da claudina -1 na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão).	32
4.3 Análise da expressão de claudina -4 na DA	33
4.3.1 Expressão da claudina-4 na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença, a espessura da epiderme, a eosinofilia e a dosagem de IgE.	33
4.3.2 Expressão da claudina -4 na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão).	34
4.4 Análises da espessura da epiderme na DA	35
4.4.1 Avaliação da espessura epidérmica (μm) e sua relação com a gravidade da DA, IgE sérica e eosinofilia.	35
4.4.2 Análise da espessura da epiderme e expressão das proteínas de barreira filagrina, claudina -1 e claudina -4 nas amostras de pele atópica sem lesão.	35
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	41
7 ANEXO	43
7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	43
7.2 Anexo B: tabelas com os resultados obtidos no estudo	48
8 REFERÊNCIAS	52
9 APÊNDICE	
APÊNDICE A – Artigo: Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis	

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BC	Barreira Cutânea
CLDN 1	Claudinas-1
CLDN 4	Claudinas-4
CLDN	Claudinas
DA	Dermatite Atópica
EVK	Erupção Variceliforme de Kaposi
EASI	<i>Eczema Area and Severity Index</i>
FLG	Filagrina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSV	<i>Herpes simplex</i>
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas
JAM-1	Molécula de Adesão Juncional-1
MCV	<i>Molluscum contagiosum</i>
MUPP-1	Proteína Multi-PDZ -1
NMF	Fatores Naturais de Hidratação
OC	Ocludina
PBS	Solução Salina Tamponada
PCA	Ácido 5-Carboxílico-Pirrolidone
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEWL	Perda de Água Transepidérmica
TJ	<i>Tight Junctions</i>

TLR-2	<i>Toll-Like Receptor-2</i>
UCA	Ácido Urocânico
ZO-1	<i>Zonnula Occludens-1</i>
ZO-2	<i>Zonnula Occludens-2</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do modelo “parede de tijolos” da camada córnea.....	4
Figura 2	Imuno-histoquímica de epiderme humana com marcador para filagrina.....	6
Figura 3	Representação da estrutura básica dos componentes das <i>tight junctions</i> (TJ).....	9
Figura 4	Representação do corneodesmossoma ligando duas células adjacentes.	12
Figura 5	Representação dos corpos lamelares (CL) presentes nos ceratinócitos.....	14
Figura 6	Resumo das alterações da barreira cutânea que podem ser encontradas na dermatite atópica e suas possíveis implicações na etiopatogenia da doença.....	17
Figura 7	Dados demográficos dos indivíduos incluídos neste estudo.....	21
Figura 8	Imuno-histoquímica de fragmentos de pele normal obtidos de biópsias.....	24
Figura 9	Expressão da filagrina (FLG) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica	29
Figura 10	Imuno-histoquímica com marcação para filagrina (FLG) em pele.....	30
Figura 11	Expressão da claudina -1 (CLDN 1) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica.....	31
Figura 12	Imuno-histoquímica com marcação para claudina -1	32
Figura 13	Expressão da claudina -4 (CLDN-4) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica.....	33
Figura 14	Imuno-histoquímica com marcação para claudina -4	34
Figura 15	Análise da espessura epidérmica (μm) na pele de doentes de dermatite atópica.	35

Figura 16	Análise da espessura epidérmica (μm) e medidas de filagrina (FLG), claudina -1 (CLDN 1) e claudina -4 (CLDN 4) na pele sem lesão (SL) de indivíduos com dermatite atópica.	36
Tabela 1	Resumo dos resultados obtidos com a análise dos dados encontrados após o estudo do material fornecido pelas biopsias.	36

RESUMO

Zaniboni MC. *Estudo da expressão de filagrina e claudinas 1 e 4 em indivíduos adultos com dermatite atópica*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea inflamatória crônica que cursa em surtos. Possui manifestação clínica variável, mas o prurido e a xerose são características frequentes, e pode estar associada a outras manifestações extra-cutâneas de atopia. Pacientes com DA apresentam maior risco de infecções por bactérias e vírus, destacando-se a erupção variceliforme de Kaposi, causada por herpes simples. A DA mostra-se como exemplo de dermatose com comprometimento da barreira cutânea, aliado a disfunção imunológica. São descritas alterações das proteínas da barreira cutânea na DA (filagrina e claudinas), relacionadas ao maior risco de infecção. **Objetivo:** Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à barreira cutânea como a filagrina, e as claudinas -1 e -4 na pele de pacientes adultos com dermatite atópica, acompanhados no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Métodos:** 32 indivíduos com diagnóstico de DA (estabelecido pelos critérios de Hanifin & Rajka) e 23 controles (indivíduos sem DA), maiores de 18 anos, foram submetidos a biópsias cutâneas. Os indivíduos com DA foram biopsiados em dois pontos, tanto na pele lesada, quanto na pele não-lesada. O material obtido foi analisado por imuno-histoquímica, através de marcadores específicos para filagrina, claudina-1 e claudina-4. As lâminas foram digitalizadas pelo *Panoramic Scan* - 3DHitech – Hungria, e as imagens analisadas pelo *software Image Pro Plus 4,5*, quanto à intensidade da expressão do marcador. A espessura média da epiderme do local estudado foi também avaliada. O grupo com DA foi também analisado quanto à gravidade da doença (EASI), níveis séricos de IgE e grau de eosinofilia. **Resultados:** Houve redução da expressão da filagrina na pele de doentes de DA em relação aos controles, tanto na pele com lesão quanto na pele sem lesão. Demonstrou-se correlação inversa na expressão da filagrina, tanto com relação à gravidade da doença quanto à espessura da epiderme. A análise das claudinas -1 e -4 demonstrou redução de ambas na pele dos doentes de DA, mas não houve correlação com a gravidade, espessura da epiderme, níveis de IgE sérica ou eosinofilia. **Conclusão:** No adulto com dermatite atópica, existe redução da expressão das proteínas relacionadas à barreira cutânea, como a filagrina e as claudinas -1 e -4. A redução da expressão da filagrina relacionou-se inversamente com a gravidade da doença, e com a espessura da epiderme, sugerindo

cronicidade das lesões. Houve redução da expressão das claudinas -1 e -4, sem relação com a gravidade da doença, espessura da epiderme, eosinofilia ou com os níveis séricos de IgE.

Descritores: Fisiopatologia epiderme; Dermatite atópica; Filagrina; Claudina -1; Claudina -4; Imuno-histoquímica; Adultos.

ABSTRACT

Zaniboni MC. *Study of expression of filaggrin and claudin 1 and 4 in adults with atopic dermatitis* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is a chronic, inflammatory dermatosis with occasional flares. Its clinical features are variable, but pruritus and xerosis are frequent, and the disease may be associated to extracutaneous atopy. Patients with AD have increased risk for bacterial or viral infection, with emphasis on eczema herpeticum due to herpes simplex. AD is an example of a compromised skin barrier, allied to na imune dysfunction. There are reports on efective proteins of the skin barrier (filaggrin and claudins), related to increased risk for infection. **Objectives:** To evaluate the expression of proteins related to the skin barrier, such filaggrin and claudins-1 and-4 in the skin of adults with AD, followed at the Department of Dermatology, University of Sao Paulo Medical School. **Methods:** 32 individuals diagnosed as AD, according to Hanifin & Rajka's criteria, and 23 non-atopic controls, above the age of 18, were biopsied. Individuals with AD were biopsied in two different sites (lesional and nonlesional skin). The specimens were analyzed by immunohistochemistry through specific markers for filaggrin, claudins 1 and 4. The slides were scanned utilizing Panoramic Scan - 3DHistech – Hungary, and images analyzed by Image Pro Plus 4,5 for the intensity of each marker. The mean epidermal thickness was also evaluated. AD patients were also analyzed for disease severity (EASI), circulating IgE levels and eosinophilia. **Results:** In lesional and nonlesional skin of AD patients there was a reduced expression of filaggrin, when compared to nonatopic controls. There was an inverse correlation of filaggrin expression with disease severity and epidermal thickness. In the skin of AD individuals, there was reduced expression of claudins 1-and-4, which did not correlate with disease severity, epidermal thickness or eosinophilia. **Conclusion:** In adults with AD, there is reduced expression of skin barrier proteins, such as filaggrin, claudins 1 and 4. The reduction of filaggrin expression had an inverse correlation with disease severity and epidermal thickness, suggesting disease chronicity. There was reduction of claudins 1 and 4, with no relation with disease severity, epidermal thickness, circulating IgE levels or eosinophilia.

Descriptors: Epidermis physiopathology; Dermatitis, atopic; Filaggrin; Claudin-1; Claudin-4; Immunohistochemistry; Adults.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma dermatose inflamatória, pruriginosa, de caráter crônico e com morfologia e distribuições típicas, que variam de acordo com a faixa etária. Possui alta prevalência na população geral, especialmente na infantil. A DA acomete cerca de 10 a 20% da população durante a infância, e por volta de 3% dos adultos.^(1, 2) No Brasil, a prevalência de história de eczema relacionado à DA em crianças de 6 a 7 anos é de 12,5% e de 10,1% entre 13 e 14 anos.⁽³⁾

Cerca de 85% dos pacientes de DA apresentam as manifestações clínicas iniciais nos primeiros cinco anos de vida, e apenas 2% dos casos novos ocorrem acima dos 45 anos de idade. Ao redor de 40% dos pacientes com DA mantêm os sintomas ao longo da vida adulta.⁽⁴⁾ Em estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo com adultos portadores de DA, demonstrou-se que 56% dos indivíduos estudados tiveram, pelo menos, uma internação durante a vida, e 88,75% desses apresentavam associação com, pelo menos, um tipo de atopia respiratória.⁽⁵⁾

A DA possui componente genético importante,⁽⁶⁾ mas a influência do meio ambiente sobre a evolução da doença também possui papel relevante.^(4, 7) Seu diagnóstico é exclusivamente clínico, feito pela distribuição característica e pelo caráter inflamatório crônico e pruriginoso de suas lesões, o histórico pessoal e familiar para atopia, os períodos de agudização da doença, além do maior risco a infecções cutâneas. Indivíduos com DA são mais susceptíveis a certas infecções, como as bacterianas, causadas pelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)^(8, 9), e as virais, como as ocasionadas por *Molluscum contagiosum* (MCV) e *Herpes simplex* (HSV).⁽¹⁰⁾

Não existem marcadores laboratoriais específicos para DA; portanto, critérios clínicos diagnósticos, como os de Hanifin e Hajka⁽¹¹⁾, são utilizados para a realização e padronização do seu diagnóstico. A DA apresenta uma variedade de lesões clínicas, que variam entre xerose, eczema e liquenificação, podendo ter mais de uma manifestação clínica num mesmo

indivíduo. Em alguns casos, indivíduos com início da dermatite após os 18 anos podem apresentar distribuição atípica das lesões(12) o que dificulta o diagnóstico correto. A DA pode estar associada a outras manifestações de atopia, como asma e rinite, além de aumento de imunoglobulina E (IgE) e eosinofilia, que ocorre com maior frequência em casos graves ou de difícil controle.(1, 4)

A resposta imunológica alterada na DA, evidenciada por altos níveis séricos de IgE encontrados em cerca de 80% dos indivíduos, pelo predomínio do padrão de resposta imunológica tipo Th2 em lesões agudas e Th1 em lesões crônicas,(13, 14) foi, por muito tempo, considerada como o principal mecanismo responsável pela formação das lesões e alterações da permeabilidade cutânea (teoria “inside-outside”). Entretanto, algumas evidências mostram que alterações próprias da barreira cutânea podem contribuir, ou mesmo desencadear este processo inflamatório, a saber: 1- indivíduos com DA que apresentam mutações do gene da filagrina costumam ter quadros mais graves e maior associação com asma;(15, 16) 2- alterações significativas nos lipídeos epidérmicos foram descritos na pele de doentes de DA, e consequente alterações de permeabilidade, tal como o aumento de perda de água transepidérmica (TEWL), que pode ser observado em pele clinicamente sem lesão;(17-19) 3- a maior colonização da pele do atópico pelo *S. aureus*, e consequente exposição aos seus superantígenos, pode estar relacionada às alterações do pH encontradas na pele de indivíduos portadores de DA;(20-22); 4- o pH ligeiramente mais alcalino encontrado na superfície epidérmica dos portadores de DA pode, além de alterar a composição da microbiota cutânea, como citado acima, interferir na excreção dos corpos lamelares, alterando os lipídeos intercelulares e a excreção de peptídeos do sistema imune inato, como a $\beta 2$ defensina.(22, 23)

O uso de hidratantes é fundamental no tratamento da DA, tanto nas crises como na prevenção dessas, por contribuir para a reparação da barreira cutânea. Assim, alguns autores desenvolveram a teoria “outside-inside”, em que a barreira cutânea passa a ter papel fundamental na

fisiopatologia da DA, e não mais representa mera consequência das alterações imunológicas.(4, 7, 24-28)

Portanto, uma melhor caracterização da barreira cutânea na dermatite atópica, incluindo a variação da expressão de determinadas proteínas que a compõem, como a filagrina (FLG) e as claudinas -1 (CLDN-1) e -4 (CLDN-4), faz-se necessária, uma vez que alterações destas impactam direta ou indiretamente na resposta imune, tanto inata quanto adaptativa.

1.1 A barreira cutânea

Proteção do hospedeiro contra agentes agressores físicos, químicos ou biológicos corresponde a uma das funções mais relevantes da pele. A camada córnea é o principal agente desta barreira, organizando-se por meio do modelo “parede de tijolos”,(29) em que os tijolos seriam os ceratinócitos, com sua estrutura protéica e hidrofílica, e o cimento corresponderia aos lipídeos cutâneos, hidrofóbicos e de características únicas (Figura 1).(30, 31)

Figura 1 - Representação esquemática do modelo “parede de tijolos” da camada córnea, mostrando os corneócitos (C), entremeados pelos lipídeos intercelulares (indicado pela seta).

Proteínas presentes na epiderme, como a filagrina (invólucro córneo)(32, 33), e um grupo de proteínas expressas na membrana celular, como as claudinas, (*tight junctions* ou TJ),(34) estão implicadas com as alterações da barreira cutânea em animais experimentais e em humanos.(28, 34-36) Alterações da claudina -1, proteína da família das TJ, estão relacionadas a aumento da TEWL e a infecções virais na pele e em outros órgãos,(35, 37-41), enquanto que a deficiência da filagrina já foi bem determinada na ictiose vulgar e pode estar alterada em diversas enfermidades relacionadas às alterações da barreira cutânea (BC).(42-45)

A defesa da pele, seja ela relacionada ao corneócito, como na proteção contra radiação ultravioleta, ou à matriz extracelular, como, por exemplo, na barreira antimicrobiana do sistema imune inato, associada aos lipídeos de superfície, confere uma característica filmógena ao estrato córneo e define a localização específica de cada mecanismo desta defesa.(46)

1.1.1 Proteínas de relevância funcional da barreira cutânea

1.1.1.1 Filagrina

A filagrina é uma proteína formada pelo ceratinócito, a partir da pró-filagrina. É a principal proteína dos grânulos de querato-hialina, presentes nas camadas mais superficiais de ceratinócitos vivos da epiderme. Estes grânulos podem ser visualizados através da microscopia óptica a partir da camada granulosa, daí a origem do seu nome. A conversão da pró-filagrina em filagrina, ambas proteínas intracelulares, (Figura 2) se dá por meio da desfosforilação e proteólise por serino-proteases, liberando múltiplos monômeros ativos de filagrina.^(33, 47) Com a diminuição do gradiente hídrico nas camadas mais externas da epiderme, ocorre a hidrólise da filagrina em aminoácidos higroscópicos. Interessante ressaltar que ambientes extremamente secos, com umidade relativa abaixo de 40%, levam à

diminuição da hidrólise da filagrina, com consequente aumento do ressecamento epidérmico.(48-52)

Os aminoácidos formados, como arginina, glutamina e histidina, são encontrados no espaço intercelular. A partir destes aminoácidos, serão formados alguns dos fatores naturais de hidratação (NMF), como o ácido urocânico (UCA) nas formas *cis* e *trans*, e o ácido 5-carboxílico-pirrolidone (PCA), importantes para a hidratação da camada córnea e manutenção do pH^(32, 33, 47, 49). Já foi demonstrado que estes dois subprodutos da filagrina possuem efeitos inibitórios sobre o crescimento do *S. aureus*, independentemente da sua ação sobre o pH.(53)

Figura 2 - Imuno-histoquímica de epiderme humana com marcador para filagrina, mostrando o padrão intracelular da expressão dessa proteína e sua expressão nas camadas mais superficiais da epiderme.

O gene da filagrina está localizado no cromossoma 1q21, no chamado complexo de diferenciação epidérmica.⁽⁵⁴⁾ Em 1996, Seguchi *et al.*⁽⁵⁵⁾ demonstram a diminuição da expressão da filagrina na pele de indivíduos atópicos. Mais recentemente, mutações com perda de função do gene da filagrina (*FLG*), à semelhança das encontradas na ictiose vulgar(44), foram

descritas em indivíduos com dermatite atópica.(45, 56, 57) Nestes doentes, há maior risco de início precoce da doença, persistência da DA na idade adulta, maior risco de alergias, associação com altas taxas de IgE e com outras manifestações de atopia, como a asma.^(15, 16, 58-60)

Ainda, Brown *et al.*, em 2011(61), mostram relação entre pacientes de DA com a mutação do *FLG* e alergia ao amendoim mediada por IgE. Esta relação parece ser resultado da maior permeabilidade cutânea, com consequente aumento à exposição a alérgenos.⁽⁶²⁾ Também já foi relatado que a deficiência do *FLG* aumenta o risco à infecção pelo HSV, sob a forma de erupção variceliforme de Kaposi (EVK).(63)

Em 2007, Howell *et al.*(64) reportam que as interleucinas (IL) -4 e -13, presentes nas lesões inflamatórias da DA, levariam à diminuição na expressão da filagrina nos ceratinócitos. Em 2012, Kezic *et al.*(65) correlacionam a diminuição do NMF no estrato córneo de indivíduos com DA e mutações no *FLG*, ao aumento de citocinas da família da IL-1, na pele sem lesões. Esta família de interleucinas possui elementos com características pró-inflamatórias, como a IL-1 α , sugerindo que o início da inflamação possa decorrer das alterações da barreira cutânea.

Portanto, pacientes que apresentam DA associada à deficiência de expressão do *FLG* exibem menor hidratação do estrato córneo, maior perda de água transepidérmica em relação ao grupo controle,⁽⁵⁸⁾ e maior risco de desenvolver alergias, asma e rinite alérgica. Além disso, as alterações da BC causadas pela deficiência de filagrina podem levar a quadros inflamatórios,⁽⁶⁶⁾ e à inflamação, que, por sua vez, reduz a expressão desta proteína pelos ceratinócitos.(65)

DERMATITE ATÓPICA E FILAGRINA:

- diminuição da expressão da filagrina.
- mutações do gene da filagrina:
 - maior risco de início precoce da doença;
 - persistência da DA na idade adulta;
 - maior risco de alergias;
 - associação com altas taxas de IgE e com outras manifestações de atopia;
 - maior risco de infecção pelo HSV-erupção variceliforme de Kaposi.

1.1.1.2 *Tight junctions*

As junções intercelulares do tipo *tight junctions* (TJ) são proteínas transmembranosas, encontradas nos epitélios simples e estratificados de mamíferos. Na epiderme, são encontradas na região apical dos ceratinócitos, sempre próximas às junções aderentes, concentrando-se na camada granulosa.⁽³⁴⁾ São proteínas de expressão ativa, podendo aumentar rapidamente após agressões à epiderme e por ação de bactérias, como o *Staphylococcus aureus*, via ativação do *toll-like receptor-2* (TLR-2).⁽⁶⁷⁾

As TJ são essenciais para a diferenciação celular e queratinização das células epidérmicas.^(68, 69) Em doenças com alterações da queratinização, como psoríase e ictiose vulgar, podem ser encontradas inclusive nas camadas mais profundas da epiderme.^(70, 71) Apresentam papel importante na permeabilidade seletiva epidérmica, controlando o fluxo paracelular de substâncias, como hormônios, citocinas e eletrólitos, funcionando como “porteiros”.⁽⁷⁰⁾ A permeabilidade depende diretamente do tamanho e da especificidade iônica da molécula. Esta função parece estar localizada, principalmente, na segunda camada mais externa de células granulosas da

epiderme.⁽⁷²⁾ Além da função de controlar a permeabilidade intercelular, estas estruturas são importantes na manutenção do microambiente epidérmico, funcionando como marcadores de “território” celular, controlando a proliferação das células e metástases tumorais.⁽⁷³⁻⁷⁶⁾

A porção intracelular das TJ liga-se às proteínas plasmáticas do citoesqueleto, enquanto a porção extracelular forma alça no espaço intercelular, conectando-se com a alça da célula adjacente. São formadas pelas ocludinas, as claudinas (CLDN), *zonula occludens*-1 (ZO-1) e -2 (ZO-2), molécula de adesão juncional-1 (*junctional adhesion molecule*-1 ou JAM-1), e a proteína multi-PDZ -1 (MUPP-1) (Figura 3).^(34, 71)

Figura 3 - Representação da estrutura básica dos componentes das *Tight Junctions* (TJ): claudina (CLDN), ocludina (OC), *zonula occludens*-1 e -2 (ZO), *junctional adhesion molecule*-1 (JAM-1), e a proteína multi-PDZ -1 (MUPP-1).

Das proteínas pertencentes à família das TJ, as claudinas são as mais estudadas; mais de 20 subtipos de claudinas já foram descritos em diversos

epitélios. Estas proteínas são tecido-específicas, ou seja, cada epitélio possui sua claudina característica. São essenciais para a diferenciação celular, queratinização e descamação das células epidérmica.^(69, 77) Na pele, já foi demonstrada a importância das claudinas-1 e -4 (CLDN 1 e CLDN 4) para manutenção da barreira epidérmica.^(74, 78, 79)

Em 2002, Furuse *et al.*⁽⁷⁴⁾ demonstram que a deficiência de claudina 1 em camundongos leva a grandes perdas de água transepidérmica e alterações hepáticas, culminando em óbito. Estes animais apresentam epiderme estruturalmente normal, mas com perda importante na função da barreira cutânea. Quadro clínico semelhante, mas sem óbito, foi descrito em humanos neonatos portadores da síndrome ictiose-esclerose-colangite, em que foram demonstradas mutações na claudina-1.⁽⁸⁰⁾

Na pele sem lesão de indivíduos com dermatite atópica, a claudina-1 aparece significativamente reduzida, quando comparada à pele de indivíduos não atópicos e portadores de psoríase.⁽³⁸⁾ No mesmo estudo, demonstrou-se relação inversa entre a expressão da claudina-1 e a presença dos marcadores de resposta imunológica padrão Th2, sugerindo que esta proteína pode afetar a resposta imunológica a possíveis alérgenos ambientais.⁽³⁸⁾

As proteínas das TJ, claudinas-1, -4, ocludina e ZO-1 são importantes na permeabilidade paracelular epidérmica a grandes moléculas; portanto, sua redução levaria a aumento da permeabilidade cutânea a alérgenos de grandes moléculas.⁽⁸¹⁾

Ainda, muito se tem estudado sobre a relação entre as claudinas e a invasão viral em diversos órgãos. A associação mais estudada é o vírus da hepatite C (HCV) e a claudina. A claudina-1 teria importância no mecanismo de invasão viral dos tecidos, mas seu papel ainda não está bem estabelecido; há controvérsias com relação à expressão da CLDN 1 na vigência da infecção.^(39, 82) Também há descrições da relação entre outras infecções causadas por vírus e as claudinas, como no caso dos vírus da imunodeficiência humana (HIV),⁽⁸³⁾ papiloma vírus humano (HPV)⁽⁴¹⁾ e

vírus da dengue.⁽⁸⁴⁾ Na DA, a redução da claudina-1 poderia levar a aumento do risco pelo HSV-1.^(38, 63)

DERMATITE ATÓPICA E *TIGHT JUNCTION*:

- diminuição da expressão na pele sem lesão.
 - favorece infecção pelo Herpes Vírus tipo I, e outras infecções virais cutâneas;
 - aumento da permeabilidade paracelular;
 - aumento do risco a alergias a grandes moléculas.
- proteínas de expressão ativa:
 - aumentam com a colonização do *Staphylococcus sp*, via Tool Like Receptor 2;
 - diminuem com aumento de citocinas padrão Th2.

1.1.1.3 Corneodesmosomas:

Entre a camada granulosa e córnea da epiderme, os desmosomas sofrem modificações na desmoglea e perdem sua ligação com a queratina do invólucro córneo, transformando-se em corneodesmosomas (Figura 4). Os corneodesmosomas são os principais responsáveis pela adesão dos corneócitos. Proteases e inibidores de proteases, excretados pelos corpos lamelares, estão envolvidos no controle da quebra dos corneodesmosomas. O equilíbrio entre ambos determina a velocidade de descamação das células epiteliais e alterações em seu transporte, sua secreção e sua estrutura.⁽⁸⁵⁾

Figura 4 - Representação do corneodesmossoma ligando duas células adjacentes.

Caso a degradação dos corneodesmossomas esteja aumentada, ocorrerá diminuição da espessura da camada córnea, e aumento da permeabilidade cutânea, enquanto que o retardo na sua degradação levará à hiperkeratose.⁽⁸⁵⁾ Além das substâncias produzidas pelos ceratinócitos, fatores externos, tais como o pH, uso de sabões e proteases bacterianas, também influenciam na quebra dos corneodesmossomas.⁽⁸⁶⁾ As TJ presentes nas camadas granulosa e córnea parecem proteger os corneodesmossomas da quebra precoce.⁽⁷⁷⁾

Na dermatite atópica, a alteração do pH,⁽²⁰⁾ o aumento da ação da serino-protease, a diminuição da claudina-1 e ação das proteases do *S.aureus* poderiam interferir na quebra dos corneodesmossomas, e modificar a descamação das células epidérmicas, definindo alterações de barreira e, também, influenciando na clínica das lesões.

DERMATITE ATÓPICA E CORNEODESMOSSOMAS

- aumento da quebra pela diminuição da CLDN 1, elevação do pH, proteases;
 - alteração na descamação;
 - maior permeabilidade epidérmica.

1.1.2 Lipídeos da barreira

A camada córnea possui dois grupos de lipídeos distintos: os lipídeos de superfície, compostos por ácidos graxos livres de cadeia longa, que formam o manto lipídico ácido da superfície cutânea e são excretados pelas glândulas sebáceas, e os lipídeos intercelulares, em que são armazenados água e eletrólitos, compostos por 50% de ceramidas, 25% de colesterol e 15% de ácidos graxos livres de cadeia curta.(19, 31, 87) São excretados pelos ceratinócitos por meio dos corpos lamelares,(87) e se distribuem no espaço intercelular paralelamente, formando estrutura multilamelar.

Os corpos lamelares contêm fosfolipídeos, glucosilceramidas, esfingomielinas e sulfato de colesterol, além de substâncias que os converterão nos lipídeos lamelares do espaço extracelular (ex. β glucoceribrosidase). A partir destes precursores, serão formados ceramidas, ácidos graxos livres de cadeia curta, glicerol e colesterol. Também estão presentes nos corpos lamelares peptídeos do sistema imune inato como a β 2 defensina e proteases. (Figura 5) Estas últimas, dentre outras ações, atuam na quebra dos corneodesmosomas.(19, 21) Algumas destas proteases e lipases possuem sua atuação ligada ao pH.(23, 88)

Figura 5 - Representação dos corpos lamelares (CL) presentes nos ceratinócitos, com os lipídios precursores dos lipídios intercelulares (●) suas enzimas conversoras, (★) e peptídeos do sistema imune inato (★).

Indivíduos com dermatite atópica apresentam alterações nos lipídios cutâneos, tanto em quantidade quanto em qualidade. Os lipídios de superfície estão diminuídos e os intercelulares apresentam diminuição de lipídios totais, principalmente de ceramidas, de fosfolípidos e ésteres de esterois, com aumento de ácidos graxos livres e esterois(18). As ceramidas, em especial a ceramida 1, encontra-se diminuída tanto na pele lesada como na pele aparentemente sem lesão dos indivíduos atópicos.(89-92) Estas alterações modificam a barreira cutânea, aumentando a TEWL, e gerando ressecamento dessa. Ocorre, também, alteração da hidrólise da filagrina, que é dependente do gradiente hídrico, e pode estar reduzida em ambientes com umidade abaixo de 40%.(51)

DERMATITE ATÓPICA E LIPÍDEOS:

- alteração na excreção dos corpos lamelares;
- redução global dos lipídeos epidérmicos, em especial, ceramidas;
- desarranjo das lamelas pela alteração do pH;
 - maior ação de proteases e maior quebra corneodesmossomas – maior descamação;
 - aumento da TEWL;
 - redução da hidrólise filagrina.

1.1.3O pH ácido da camada córnea

O pH nas camadas mais externas da pele varia entre 5.0 e 5.5, ao contrário das mais profundas, em que é de, aproximadamente, 7.0. A acidez da superfície tem se mostrado importante mecanismo de proteção contra a colonização e invasão de patógenos (*S. aureus* possui pH de crescimento ideal em 7.0).(93)

O pH atua na recuperação contra os danos causados à integridade cutânea, favorece a manutenção dos lipídeos lamelares por meio da ativação de hidrolases de lipídeos, como a β -glucocerebrosidase e fosfolipase, importantes para a formação das ceramidas e ácidos graxos livres, e participa, ainda, da manutenção da integridade e coesão da camada córnea. O pH 7.0 estimula a ação de proteases, que resulta na maior quebra dos desmossomas.(23, 94, 95) Além disso, a simples elevação do pH é capaz de promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e a IL-1 β .(96, 97)

Diversos mecanismos parecem participar do processo de acidificação da pele, como a cobertura cutânea pelos ácidos graxos livres de cadeia longa, produzidos pelas glândulas sebáceas, a excreção de ácido láctico pelas glândulas écrinas, a formação dos lipídeos intercelulares e a hidrólise da filagrina, com liberação de histidina e produção do ácido urocânico na sua forma cis. (94, 98) Esta via filagrina-histidina-ácido urocânico, apesar de diminuir o pH, parece não ser fundamental na manutenção da acidez cutânea, como demonstrado por Fulhr *et al.* em 2010.(99)

Na DA, o pH da superfície cutânea costuma ser mais alcalino que o tradicionalmente encontrado.(100) Isto gera diminuição da produção de ceramidas, e desarranjo dos lipídeos intercelulares, desencadeando a xerose pelo aumento da TEWL. O pH elevado pode, ainda, provocar o aumento da descamação pela ativação de protease, maior quebra dos desmossomas, além de desencadear inflamação ao ativar interleucinas. Há maior colonização e risco de infecção pelo *S. aureus*, facilitada pela elevação do pH, mais próximo ao seu pH de crescimento ideal.(88, 101)

DERMATITE ATÓPICA E pH:

- pH elevado;
 - maior risco de infecção pelo *Staphylococcus aureus*;
 - desarranjo dos lipídeos intercelulares com aumento da perda de água transepidérmica;
 - ativação e perpetuação do processo inflamatório;
 - aumento da quebra dos corneócitos.

Pacientes com dermatite atópica apresentam xerose, maior permeabilidade cutânea, susceptibilidade a infecções cutâneas, maior risco de sensibilização a alérgenos externos e resposta imunológica inadequada. A barreira cutânea parece exercer, cada vez mais, importante papel na fisiopatologia da DA, deixando de ser apenas consequência, para ter papel ativo no aparecimento das lesões cutâneas (Figura 6).

Figura 6 - Resumo das alterações da barreira cutânea que podem ser encontradas na dermatite atópica e suas possíveis implicações na etiopatogenia da doença.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à manutenção da barreira cutânea como a filagrina, e as claudinas -1 e -4 na pele com lesão e sem lesão de pacientes adultos com dermatite atópica e na pele sã de controles não atópicos.

2.2 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Avaliar a relação entre a expressão das proteínas filagrina, claudinas-1 e -4 com a gravidade da doença (índice de gravidade EASI = *eczema area and severity index*);
2. Avaliar a relação entre a expressão das proteínas filagrina, claudinas-1 e -4 com a espessura da epiderme da DA;
3. Avaliar a relação entre a expressão das proteínas filagrina, claudinas-1 e -4 e níveis séricos de IgE;
4. Avaliar a relação entre a expressão das proteínas filagrina, claudinas-1 e -4 e eosinofilia;
5. Avaliar a expressão das proteínas filagrina, claudinas-1 e -4 na pele com lesão versus pele sem lesão dos indivíduos com DA.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados 32 doentes adultos, 22 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, do Ambulatório de Dermatite Atópica da Clínica de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O diagnóstico de DA foi realizado através dos critérios maiores e menores de Hanifin e Rajka,¹¹, e avaliados clinicamente quanto à gravidade segundo o EASI (Índice de gravidade e área de eczema)(102). Também foram incluídos 23 controles acima de 18 anos, 13 do sexo masculino e 10 do sexo feminino sem diagnóstico de dermatite atópica ou outro quadro de atopia (Figura 7).

	controles	doentes DA
n	23	32 (10 SL)
gênero	13 M / 10 F	22 M/ 10 F
idade	23 a 80 anos	19 a 61 anos
média	56 anos	30 anos
eosinófilo sérico		1,1 a 24,2%
média		12,3%
IgE		343 a 119.000 UI/ml
média		23.529,1 UI/ml
EASI		8,6 a 59,4
média		32,18

Figura 7 - Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo. SL=se lesão; M=masculino; F=feminino; EASI=*eczema area and severity index*.

Os sujeitos da pesquisa foram incluídos no estudo, após lerem e concordarem com o termo de consentimento e livre esclarecido (Anexo A).

3.1.1 Critérios de exclusão

Para o grupo de DA, foram excluídos os indivíduos com idade menor que 18 anos, gestantes, e aqueles que não preenchem os critérios diagnósticos de Hanifin & Rajka.

3.2 Métodos

Os pacientes com DA foram submetidos à biópsia de pele em área com lesão, com *punch* de 4 mm em cada indivíduo, sob anestesia local com lidocaína 1%, e, posteriormente, suturadas com fio mononylon 5-0. Quando o paciente apresentava área clinicamente sem lesão, foram realizadas 2 biopsias, uma em área com lesão e a outra em área aparentemente sã, aleatória, na mesma região, a, pelo menos, 5 cm da lesão clínica mais próxima. As amostras coletadas foram emblocadas em parafina e, posteriormente, analisadas por imuno-histoquímica para determinar a expressão de filagrina e claudinas 1 e 4 em cada grupo. Foi feito o controle positivo e negativo para testar cada um dos marcadores imuno-histoquímicos. (Figura 8)

3.2.1 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de quatro μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%.

A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em três banhos de xilol à temperatura ambiente durante 20 minutos cada e, posteriormente, hidratados em sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

Figura 8 - Imuno-histoquímica de fragmentos de pele normal obtidos de biópsias: controles positivos para filagrina (A), claudina-1 (B), claudina-4 (C), coradas em marrom, e controle negativo para filagrina (D). Aumento de 100X.

Realizado bloqueio de peroxidase endógena em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada, e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9.0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada, e submersas em PBS pH 7.4.

Após esta etapa, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As reações foram visualizadas por meio do cromógeno diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, código D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico por meio dos controles positivos que acompanham as reações. Os controles positivos aos antígenos estudados foram: pele normal para células com expressão de claudinas 1 e 4, e filagrina. Os controles negativos das reações foram obtidos por meio da omissão do anticorpo primário, que foram substituídos por PBS. Após feito o controle de cor, as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e, a seguir, foram lavadas em água corrente, e secadas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

3.2.2 Técnica de imuno-histoquímica para a demonstração de claudinas 1 e 4, e filagrina

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários policlonal anticlaudina 1 (Zymed - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, cód.51-9000) diluído a 1:400, policlonal anti-claudina 4 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA, cód. RB-9266-PO) diluído a 1:200, e monoclonal antifilagrina (Novocastra, Newcastle, UK, cód. NCL-Filaggrin) diluído a 1:150 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS, pH 7,4.

3.2.3 Análise das lâminas

Depois de coradas, as lâminas foram digitalizadas pelo *Panoramic Scan* - 3DHitech – Hungria. Os cortes foram fotografados em 3 campos de 760 x 1192 µm cada, com aumento de 100X e as imagens salvas no formato JPEG. As imagens obtidas foram analisadas pelo *software* Image Pro Plus 4,5.

Para a análise, demarcou-se uma área de epiderme a ser avaliada, com posterior mensuração da densidade do pigmento usado para corar as proteínas do estudo presentes nesta área. A seguir, calculou-se o valor da área demarcada, e, a partir destes dados, foi calculada a porcentagem de marcador em relação à área previamente demarcada. Para se determinar a espessura da epiderme, foi traçada uma linha no limite superior da camada granulosa, e outra no limite entre a camada basal e a derme. A espessura (em micrômetros) foi obtida pela média das distâncias entre linhas traçadas no limite superior da camada granulosa e o limite entre a camada basal e derme.

3.2.4 Análise estatística

Foram utilizados o teste não paramétrico de Mann–Whitney e o teste não paramétrico de correlação Spearman. A diferença entre os grupos foi considerada com significância estatística quando $p \leq 0,05$.

Foi utilizado o programa *Prisma Graphics* para análise dos dados.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os valores obtidos nas análises das lâminas podem ser encontrados no Anexo B. Os resultados gerais das análises dos dados estão resumidos na Tabela 1.

4.1 Análise da expressão de filagrina na DA

4.1.1 Expressão da filagrina na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença (EASI), a espessura da epiderme, a eosinofilia e IgE sérica

Quando comparamos a expressão da filagrina na pele com lesão de DA com gravidade (EASI), espessura da epiderme, níveis de IgE sérica e eosinofilia, encontramos correlação inversa entre a expressão de filagrina e o EASI ($p=0,0078$ e $r=-0,4618$), bem como com a espessura da epiderme ($p=0,0138$ e $r=-0,4311$). Não houve diferença significativa entre a expressão de filagrina com a eosinofilia ou níveis séricos de IgE (Figura 9)

Figura 9 - Expressão da filagrina (FLG) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica e sua relação com: índice de gravidade EASI ($p=0,0078$) (A); espessura epidérmica (μm) ($p=0,0138$) (B); IgE sérica (UI/ml) ($p=0,8154$) (C) e eosinofilia (%) ($p=0,8923$) (D).

4.1.2 Expressão da filagrina na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão)

A Figura 10 mostra a expressão da filagrina na pele dos controles sadios e dos doentes de DA (pele com lesão e sem lesão). Houve diferença significativa da expressão da filagrina cutânea entre os controles ($p < 0,001$) e os doentes de DA ($p = 0,0198$), mas não houve diferença entre os grupos de DA (pele com lesão X sem lesão).

Figura 10 - Imuno-histoquímica com marcação para filagrina (FLG) em pele de controles sadios (A), doentes de dermatite atópica com lesão (B), dermatite atópica sem lesão (C), aumento de 100x. Expressão da FLG na pele dos controles sadios (CO), em comparação com: (D) pele de dermatite atópica com lesão (L) ($p < 0,001$); (E): pele de dermatite atópica sem lesão (SL) ($p = 0,0198$); (F): dermatite atópica com lesão (L) e sem lesão (SL) ($p = 0,1791$).

4.2 Análise da expressão de claudina -1 na DA

4.2.1 Expressão da claudina -1 na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença, a espessura da epiderme, a eosinofilia e níveis séricos de IgE.

A avaliação da expressão da claudina -1 (CLDN-1) na pele com lesão de DA e sua relação com parâmetros como EASI, espessura epidérmica, IgE sérica e eosinofilia não mostrou significância para nenhuma das análises realizadas (Figura 11).

Figura 11 - Expressão da claudina -1 (CLDN 1) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica e sua relação com: índice de gravidade EASI ($p=0,4121$) (A); espessura epidérmica (μm) ($p=0,7972$) (B); IgE sérica (UI/ml) ($p=0,0840$) (C) e eosinofilia (%) ($p=9609$) (D).

4.2.2 Expressão da claudina-1 na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão)

A Figura 12 mostra a expressão da claudina-1 na pele dos controles sadios e nos doentes de DA (pele com lesão e sem lesão). Houve diferença significativa da expressão da claudina-1 entre os controles ($p < 0,001$) e os doentes de DA com pele com lesão e sem lesão ($p = 0,009$), mas não houve diferença entre os grupos de DA de pele com lesão e sem lesão.

Figura 12 - Imuno-histoquímica com marcação para claudina -1 em pele de controles sadios (A), doentes de dermatite atópica com lesão (B), dermatite atópica sem lesão (C), aumento de 100x. Expressão da claudina -1 (CLDN 1) na pele dos controles sadios (CO), em comparação com: (D) pele de dermatite atópica com lesão (L) ($p < 0,001$); (E): pele de dermatite atópica sem lesão (SL) ($p = 0,009$); (F): dermatite atópica com lesão (L) e sem lesão (SL) ($p = 0,7677$).

4.3 Análise da expressão de claudina -4 na DA

4.3.1 Expressão da claudina-4 na pele com lesão de DA e sua relação com: a gravidade da doença, a espessura da epiderme, a eosinofilia e a dosagem de IgE

A avaliação da expressão da claudina -4 (CLDN-4) na pele com lesão da DA e sua relação com parâmetros como EASI, espessura epidérmica, IgE sérica e eosinofilia não mostrou significância para nenhuma das análises realizadas (Figura 13).

Figura 13 - Expressão da claudina -4 (CLDN-4) na pele com lesão de doentes de dermatite atópica e sua relação com: índice de gravidade EASI ($p=0,4506$) (A); espessura epidérmica (μm) ($p=0,3724$) (B); IgE sérica (UI/ml) ($p=0,2648$) (C) e eosinofilia (%) ($p=0,2648$) (D).

4.3.2 Expressão da claudina-4 na epiderme do grupo controle, e na pele de doentes de DA (pele com lesão X sem lesão)

A Figura 14 mostra a expressão da claudina-4 na pele dos controles sadios e nos doentes de DA (pele com lesão e sem lesão). Houve diferença significativa da expressão da claudina-1 entre os controles ($p < 0,001$) e os doentes de DA ($p < 0,001$), mas não houve diferença entre os grupos de DA (pele com lesão X sem lesão).

Figura 14 - Imuno-histoquímica com marcação para claudina -4 em pele de controles sadios (A), doentes de dermatite atópica com lesão (B), dermatite atópica sem lesão (C), aumento de 100x. Expressão da claudina -4 (CLDN 4) na pele dos controles sadios (CO), em comparação com: (D) pele de dermatite atópica com lesão (L) ($p < 0,001$); (E): pele de dermatite atópica sem lesão (SL) ($p < 0,001$); (F): dermatite atópica com lesão (L) e sem lesão (SL) ($p = 0,0568$).

4.4 Análises da espessura da epiderme na DA

4.4.1 Avaliação da espessura epidérmica (μm) e sua relação com a gravidade da DA, IgE sérica e eosinofilia

A avaliação da espessura epidérmica média (μm) e sua relação com a gravidade da DA, IgE sérica e eosinofilia não mostrou significância para nenhuma das análises realizadas (Figura 15).

Figura 15 - Análise da espessura epidérmica (μm) na pele de doentes de dermatite atópica e sua relação com o índice de gravidade EASI ($p=0,1275$) (A), IgE sérica (UI/ml) ($p=0,1228$) (B), e eosinofilia (%) ($p=0,2914$) (C).

4.4.2 Análise da espessura da epiderme e expressão das proteínas de barreira filagrina, claudina -1 e claudina -4 nas amostras de pele atópica sem lesão

A Figura 16 mostra a análise da espessura da epiderme e sua relação com as proteínas filagrina, claudina -1 e claudina -4 nas amostras de pele de doentes de DA sem lesão aparente. Não houve correlação entre espessura epidérmica e alteração da expressão destas proteínas de barreira.

Figura 16 - Análise da espessura epidérmica (μm) e medidas de filagrina (FLG) ($p=0,3487$) (A), claudina -1 (CLDN 1) ($p=0,1912$) (B) e claudina -4 (CLDN 4) ($p=0,7330$) (C) na pele sem lesão (SL) de indivíduos com dermatite atópica.

	FILAGRINA	CLAUDINA-1	CLAUDINA-4
CO/DA LESÃO	↓	↓	↓
CO/DA SEM LESÃO	↓	↓	↓
DA LESÃO/ SEM LESÃO	NÃO	NÃO	NÃO
EASI	CORRELAÇÃO INVERSA	NÃO	NÃO
ESPESSURA/DA LESÃO	CORRELAÇÃO INVERSA	NÃO	NÃO
ESPESSURA/DA SEM LESÃO	NÃO	NÃO	NÃO
IGE	NÃO	NÃO	NÃO
EOSINOFILIA	NÃO	NÃO	NÃO

Tabela 1 - Resumo esquemático dos resultados obtidos referentes à expressão das proteínas de barreira (filagrina, claudinas-1 e -4). CO=controle; DA=dermatite atópica, EASI=*eczema area and severity index*.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A etiopatogenia multifatorial da dermatite atópica representa, ainda, um dos maiores desafios a serem desvendados. Distúrbios da barreira cutânea podem facilitar a penetração de micro-organismos através da pele, bem como ocasionar perda do balanço hídrico e agir como promotor da inflamação.

Na DA, ocorrem diversas alterações epidérmicas relacionadas à barreira cutânea como: elevação do pH, alteração em quantidade e qualidade dos lipídeos cutâneos, maior ação de proteases, descamação irregular dos corneócitos e redução de proteínas como a filagrina, além do rompimento de sua estrutura mecânica por meio do ato de coçar.²⁶

Mutações do gene da filagrina relacionam-se ao maior risco de asma, início precoce da doença e dificuldade de controle da DA.(16, 42, 60) Entretanto, além da filagrina, recentes achados na redução da expressão de outras proteínas que compõem a barreira cutânea, como a claudina-1, foram descritos em indivíduos com DA por De Benedetto *et al.* em 2011.⁽³⁶⁾

O presente estudo demonstrou redução da expressão da filagrina na pele de doentes de DA em relação aos controles, tanto na pele com lesão quanto na pele sem lesão.⁶⁵ Ainda, demonstrou-se correlação inversa entre a gravidade da doença e a expressão cutânea de filagrina, corroborando os dados encontrados na literatura.^{15,58}

Um dado de interesse seria o encontro de espessura epidérmica aumentada na pele de pacientes com DA, relacionado à cronicidade da doença.(103)

Em nossas amostras, quando avaliamos a espessura da epiderme e a expressão da filagrina, também encontramos correlação inversa entre os dados, sugerindo que a expressão da filagrina estaria relacionada à cronicidade das lesões.

Com relação a outras proteínas relacionadas à função de barreira cutânea, destacamos as proteínas das *tight junctions*, importantes na manutenção da permeabilidade intercelular, especialmente para moléculas grandes.⁷⁹ A expressão destas proteínas, inclusive claudinas -1 e -4, altera-se rapidamente quando ocorrem lesões da epiderme,⁽³⁴⁾ mostrando a variabilidade de sua expressão e sua importância na formação da barreira cutânea.

Ativação do *toll-like receptor* (TLR) leva ao aumento da expressão das claudinas -1 e -4.⁽⁶⁷⁾ Kirschner *et al.*, em 2009⁽¹⁰⁴⁾ mostra a redução da claudina -4 e o aumento da claudina -1 em placas de psoríase. Na dermatite atópica, ocorre redução da expressão da claudina -1,³⁶ mas há pouca ou nenhuma informação sobre a expressão da claudina -4 na DA.³⁶

Quanto à avaliação da expressão das proteínas das *tight junctions* na DA, especialmente das claudinas -1 e -4, demonstrou-se redução de ambas na pele dos doentes de DA analisados neste estudo. (Figura 17) Entretanto, ao analisarmos as proteínas da TJ em relação à gravidade da doença, e à espessura da epiderme, não encontramos correlação, como as encontradas com a filagrina.

Nossos resultados sugerem que as claudinas, por serem proteínas de expressão ativa que respondem a estímulos diferentes, como presença do *S. aureus*,⁽¹⁰⁵⁾ histamina⁽¹⁰⁶⁾ e uso de corticosteróides,⁽⁸¹⁾ devem ter sua expressão modificada por diversos fatores locais em conjunto, não avaliados neste estudo.

Futuros estudos envolvendo a análise de mutações genéticas das proteínas da barreira cutânea em doentes de dermatite atópica, pertinentes à população brasileira, deverão ser conduzidos. Ainda, a relação entre barreira cutânea alterada e a inflamação existente na DA, por meio da dosagem dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e inflamatórias, tais como interleucinas 17 e 22, deverá ser investigada.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que:

- 1) Na pele com e sem lesão do adulto com dermatite atópica, existe redução da expressão das proteínas relacionadas à barreira cutânea, como a filagrina e as claudinas -1 e 4;
- 2) A expressão da filagrina na pele com lesão do paciente com dermatite atópica correlacionou-se de forma inversa com a gravidade da doença, utilizando-se o escore EASI, e com a espessura da epiderme, sugerindo cronicidade das lesões. Não houve diferença significativa entre a expressão de filagrina com a eosinofilia ou níveis séricos de IgE;
- 3) Houve redução da expressão das proteínas das *tight junctions* na DA, especialmente das claudinas -1 e -4, sem relação com a gravidade da doença, espessura da epiderme, eosinofilia ou níveis séricos de IgE.

7 ANEXO

7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº

SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

Nº:

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

SEXO: M ☐ F

☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

Nº:

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD ()

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE FILAGRINA E
CLAUDINAS 1 E 4 EM INDIVÍDUOS ADULTOS COM DERMATITE
ATÓPICA**

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE FILAGRINA E CLAUDINAS 1 E 4 EM INDIVÍDUOS ADULTOS COM DERMATITE ATÓPICA”
2. PESQUISADOR: Valéria Aoki
CARGO/FUNÇÃO: Médica
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	(X)	RISCO MÉDIO	()
RISCO BAIXO	()	RISCO MAIOR	()
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Objetivos da pesquisa: O estudo tem como objetivo estudar e entender melhor os diferentes padrões das lesões da dermatite atópica. A dermatite atópica ou eczema é uma doença crônica que geralmente começa na infância, que causa coceiras e feridas na pele. Geralmente está associada com asma e rinite alérgica. Tem fases de melhora e piora. Pode piorar no inverno, onde há um maior ressecamento da pele, o que é agravado pelos banhos quentes. A maioria dos pacientes melhora com a idade, mas uma minoria continua a ter a dermatite durante a vida adulta. A doença apresenta vários padrões de lesões, e geralmente cada indivíduo apresenta um tipo de lesão com maior frequência que os outros. Assim, vamos estudar os portadores de dermatite atópica que apresentem lesões diferentes, para tentar melhor esclarecer o porquê destas diferenças numa mesma doença.

Procedimentos a serem realizados: O paciente selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Durante a consulta de rotina do ambulatório, após ter consentido em fazer parte do estudo, serão feitas algumas perguntas, como: se tem outros casos de eczema, rinite ou asma na família, quando começaram as primeiras feridas na pele, qual a frequência das feridas, quais os medicamentos que já foram utilizados. Será ainda feito um exame geral para verificar quais as partes do corpo estão mais comprometidas. Serão ainda pedidos aos pacientes do estudo, a realização de biopsias de pele, a partir das quais será realizado o estudo.

Os procedimentos serão feitos no próprio hospital das clínicas sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para realizar as biopsias. Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório de dermatite atópica. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Possíveis desconfortos e riscos esperados: Será realizado biopsia na pele sob anestesia local. Durante o procedimento o paciente poderá sentir dor mínima no momento da aplicação da anestesia, parecida com uma picada de formiga. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio durante o procedimento e, mais raramente pode haver infecção no local em que foi realizado a biopsia.

Benefícios que poderão ser obtidos: O paciente que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre o eczema atópico ou simplesmente descobriremos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Procedimentos alternativos: O paciente não é obrigado a realizar estes procedimentos específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo o paciente que não concordar em participar do

estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo.

Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Valéria Aoki e o pesquisador executante a Dra. Mariana Colombini Zaniboni, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 5º. Andar, PAMB-Dermatologia CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3069-6398. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-644 ramal 26, e-mail: cappelq@hcnet.usp.br.

Confidencialidade e liberação dos registros médicos: Apenas os médicos envolvidos no estudo terão, além do próprio paciente, acesso aos resultados das biopsias, bem como à identificação dos mesmos. Em nenhum momento do estudo o paciente será identificado pelo nome e também em nenhuma publicação resultante do estudo em questão. Os dados e materiais obtidos serão utilizados única e exclusivamente para esta pesquisa.

Participação: A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você está ciente que não é obrigado (a) a participar deste estudo e se em algum momento não quiser mais participar ou fazer os exames, deverá entrar em contato com a equipe do estudo, sem nenhuma penalidade por isto.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DE FILAGRINA E CLAUDINAS 1 E 4 EM INDIVÍDUOS ADULTOS COM DERMATITE ATÓPICA ”

Eu discuti com a Dra. Mariana Colombini Zaniboni sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu

consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

7.2 Anexo B: Tabelas com os resultados obtidos no estudo

A. Tabela de dados das amostras de pele obtidas de **controles** sem diagnóstico de dermatite atópica.

	S	ID	CLDN 1	ESP CLDN 1	CLDN 4	ESP CLDN 4	FLG	ESP FLG
CO01	F	47	12,07401	29,849207	2,507043	31,271673	7,098558	33,84688
CO02	M	60	10,68945	20,34042	4,892278	23,621693	7,472145	18,22167
CO03	M	64	18,4372	22,009233	4,060446	29,87056	6,18729	25,65776
CO04	F	23	15,47746	36,705507	4,213469	29,763563	5,138151	34,39405
CO05	F	78	18,00876	26,631653	5,011706	30,859487	5,711508	23,5873
CO06	M	66	14,84144	22,806497	3,273914	24,016407	5,550401	19,78107
CO07	F	48	19,02526	18,562393	1,910289	24,65363	7,231495	18,52144
CO08	M	58	12,46332	24,924397	2,988804	27,218397	4,25311	20,04089
CO09	M	57	8,38912	40,892134	8,052731	39,45557	4,139374	33,53939
CO10	M	23	6,367632	71,49279	3,485233	78,28143	1,27258	80,04225
CO11	M	66	4,849287	103,16005	6,040149	109,97038	1,606922	112,9651
CO12	M	60	14,54987	29,78052	5,757399	33,74866	6,699566	34,62351
CO13	M	44	7,222573	110,68023	5,089976	106,6139	0,304318	99,03812
CO14	F	47	16,27621	32,83711	6,456982	30,26969	5,157236	36,17188
CO15	F	38	11,58284	20,156663	4,269161	24,243023	5,915619	25,33004
CO17	F	52	15,21899	27,463923	3,566738	20,92573	4,555646	21,64389
CO18	M	80	17,29128	25,100277	10,33142	33,5791	2,779544	34,37219
CO19	M	66	7,237216	45,52731	2,606011	46,555913	6,881981	56,39134
CO20	F	33	11,41581	27,601577	6,049549	25,40006	4,531362	32,30892
CO21	F	64	12,86496	32,295447	3,532661	29,081677	5,624422	30,12554
CO22	M	79	14,73193	29,24245	5,078383	31,62039	5,090038	32,89108
CO23	F	80	11,1956	31,580243	2,881319	30,467073	4,856448	35,38855
CO24	M	67	12,88758	38,850947	4,843584	43,984807	6,953171	41,51791
MÉDIA		56,52174	12,74338	37,760477	4,647793	39,368383	5,000473	39,14786

CO= controle, SL= sem lesão, S= sexo, ID = idade, EOS= eosinofilia, ESP= espessura, CLDN= claudina, FLG=filagrina.

CO16- excluído por problema técnico na confecção das lâminas.

B. Tabela de dados das amostras de pele obtidas em áreas **com lesão** de doentes de dermatite atópica

	S	ID	EASI	IgE	EOS	CLDN 1	ESP CLDN 1	CLDN 4	ESP CLDN 4	FLG	ESP FLG
PC2	F	22	25	14000	15,7	5,562164	63,31163	4,657573	74,019887	2,925121	49,765397
PC3	F	29	40,6	60400	19,4	1,76304	117,73257	3,354729	119,5915	0,119962	97,07713
PC4	M	21	47,7	39100	11,3	5,957688	100,49895	2,213404	96,721573	1,503043	103,38824
PC5	F	43	33,5	2680	5,7	4,400257	40,397257	2,349105	44,480387	2,689525	45,03246
PC6	M	28	40,2	16700	8,7	3,345351	37,49839	1,401733	37,520913	1,979918	32,974987
PC7	M	24	47,9	3120	10,1	7,959194	63,170543	1,174454	96,9917	1,200087	60,9522
PC8	F	22	10,3	26200	7,8	4,282044	69,173923	2,403241	68,747533	3,56515	83,244897
PC9	M	37	47,2	59900	7,6	5,387664	97,308987	6,812072	102,65393	0,52488	134,3141
PC10	M	43	18,4	28300	12,7	5,525851	57,65901	4,468799	55,09837	3,862473	70,414637
PC11	F	39	31,6			6,149881	166,1749	2,373998	156,034	0,056012	171,05313
PC12	M	22	17,8	3400	8,7	2,89294	102,56504	3,243635	113,89269	3,782393	113,95935
PC13	M	24	50	46300	12,1	7,257659	124,93787	2,153601	132,53116	0,057075	119,65947
PC14	M	39	35,4	5080	6,7	3,483567	98,26415	1,82998	87,090183	1,670508	89,86342
PC15	M	20	24,7	26900	36,1	11,70609	134,76057	1,268112	164,14523	1,223245	121,75524
PC16	M	19	25,9		4,1	5,340807	53,190413	4,153269	79,052473	2,662717	75,754077
PC17	M	34	35,8	5530	16,1	11,46569	98,638843	1,504688	138,76757	0,978337	133,9619
PC18	M	24	35	30000	15,2	10,08119	133,94863	3,381338	103,2407	2,320269	157,88043
PC19	M	20	14,4	4910	7,6	9,290072	84,791257	3,459347	91,717077	0,774136	108,67947
PC20	M	29	11,2	4070	14,2	3,731594	38,448937	3,486803	41,697607	1,622446	56,07265
PC21	M	21	38,5	2870	6,8	9,191107	97,347763	3,876056	103,16185	1,227966	87,89251
PC22	F	42	8,6	5180	8,5	9,939224	93,255227	1,153955	79,662307	4,240808	92,10982
PC23	M	37	36,3			6,876861	65,557033	1,357538	83,056237	2,424809	74,26943
PC24	M	19	22	4140	5,9	14,89563	84,00446	2,927929	94,215767	1,47252	80,5664
PC25	F	61	59,4	53500	16,8	3,285038	52,430953	3,644735	41,59924	2,022592	65,324437
PC26	M	24	45,8	13100	3,5	5,513158	103,71041	2,382773	131,02	1,81185	113,18791
PC27	F	48	15,9	343	1,1	11,2617	39,304163	1,733579	48,613747	1,594561	38,54214
PC28	M	48	47,9	34800	16,9	15,97506	43,7651	1,949492	51,665093	1,911607	51,644407
PC29	F	20	34,8	119000	5,5	2,925983	86,708057	3,993048	97,357623	1,012477	100,12169
PC30	M	28	35,2	5260	6,6	6,118467	89,239147	1,369604	131,92933	1,102398	100,29578
PC31	M	19	35,2	58400	24,2	3,570658	86,149677	1,643828	94,944383	2,329681	110,72354
PC32	F	31	13,2	3400	6,9	13,86056	57,61574	3,151585	54,66091	2,734559	41,619677
PC33	M	19	21,4	6050	10,7	9,091378	52,6439	3,722972	76,88346	0,687372	75,675097
MÉDIA		30	31,5	23539	12,3	7,127737	82,318859	2,768655	90,398889	1,815328	89,305501

PC= paciente, S= sexo, ID = idade, EOS= eosinofilia, ESP= espessura, CLDN= claudina, FLG=filagrina.

PC1- excluído durante o estudo por problemas técnicos com a imuno-histoquímica

C. Tabela de dados das amostras de pele obtidas em áreas **sem lesão de doentes de dermatite atópica.**

	S	ID	EASI	IgE	EOS	CLDN 1	ESP CLDN 1	CLDN 4	ESP CLDN 4	FLG	ESP FLG
PC05	F	43	33,5	2680	5,7	5,353138	46,7612	0,60863	53,253517	3,739953	41,96334
PC06	M	28	40,2	16700	8,7	1,475154	46,85891	0,880321	40,223883	4,960367	50,37409
PC10	M	43	18,4	28300	12,7	6,123952	114,3187	0,568582	125,80607	2,007106	152,1775
PC11	F	39	31,6			5,229944	31,15224	1,413022	26,71813	0	31,80842
PC12	M	22	17,8	3400	8,7	7,752144	52,17707	2,484602	60,30545	5,286722	55,78979
PC13	M	24	50	46300	12,1	5,397179	109,4259	1,846928	141,83787	0,396971	124,5764
PC15	M	20	24,7	26900	36,1	12,96932	162,4	2,245093	123,03525	0,576568	192,6262
PC20	M	29	11,2	4070	14,2	3,731594	38,44894	1,661734	25,0124	6,873267	30,37759
PC26	M	24	45,8	13100	3,5	8,278726	27,86418	2,356152	36,453513	3,951269	33,92992
PC28	M	48	47,9	34800	16,9	9,148418	69,6681	3,942862	38,162583	2,389413	46,19777
MÉDIA		32	32,11	19583	10,31	6,545957	69,907521	1,800793	67,0808663	3,0181635	75,9821

PC= paciente, SL= sem lesão, S= sexo, ID = idade, EOS= eosinofilia, ESP= espessura, CLDN= claudina, FLG=filagrina.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Kapoor R, Menon C, Hoffstad O, Bilker W, Leclerc P, Margolis DJ. The prevalence of atopic triad in children with physician-confirmed atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:68-73.
2. Peroni DG, Piacentini GL, Bodini A, Rigotti E, Pigozzi R, Boner AL. Prevalence and risk factors for atopic dermatitis in preschool children. *British Journal of Dermatology*. 2007;158(3):539-43.
3. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI, Grp IPTS. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;124(6):1251-8.
4. Schmitz R, Atzpodien K, Schlaud M. Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents - a nationwide health report. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2012;23(8):716-23.
5. Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R, Zaniboni MC, Ishizaki AS, Costa AA, et al. Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(3):270-5.
6. Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child*. 1992;67(8):1018-22.
7. Flohr C, Yeo L. Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis revisited. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:1-34.
8. Park HY, Kim CR, Huh IS, Jung MY, Seo EY, Park JH, et al. Staphylococcus aureus Colonization in Acute and Chronic Skin Lesions of Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol*. 2013;25(4):410-6.
9. Abeck D, Mempel M. Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol*. 1998;139 Suppl 53:13-6.
10. Wollenberg A, Wetzel S, Burgdorf WH, Haas J. Viral infections in atopic dermatitis: pathogenic aspects and clinical management. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(4):667-74.
11. Hanifin JM, Rajka G. DIAGNOSTIC FEATURES OF ATOPIC-DERMATITIS. *Acta Dermato-Venereologica*. 1980;44-7.
12. Ozkaya E. Adult-onset atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(4):579-82.
13. Leung DY, Geha RS. Immune mechanisms in atopic dermatitis. *Springer Semin Immunopathol*. 1981;4(3):275-91.
14. Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(6 Suppl):S128-39.
15. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(6):1361-70 e7.
16. O'Regan GM, Irvine AD. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clinical and Experimental Allergy*. 2010;40(7):965-72.
17. Addor FAS, Takaoka R, Rivitti EA, Aoki V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *International Journal of Dermatology*. 2012;51(6):672-6.
18. Proksch E, Jensen JM, Elias PM. Skin lipids and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*. 2003;21(2):134-44.

19. KR F. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2531-46.
20. Rippke F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *American Journal Of Clinical Dermatology.* 2004;5(4):217-23.
21. Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res.* 49. United States 2008. p. 4-11.
22. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology.* 2007;29(1):3-14.
23. Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *Journal of Investigative Dermatology.* 2003;121(2):345-53.
24. Fahy CM, McLean WH, Irvine AD, Fallon PG. Environmental influences on a model of atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2011;131:S61-S.
25. Elias PM, Feingold KR. Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Archives of Dermatology.* 2001;137(8):1079-81.
26. Cork MJ, Robinson D, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, Tazi-Ahnini R, et al. Skin barrier damage: Cause or consequence of atopic dermatitis? *Journal of Investigative Dermatology.* 2005;125(3):605-.
27. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2009;129(8):1892-908.
28. Wolf R, Wolf D. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology.* 2012;30(3):329-34.
29. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med.* 1999;31(1):5-19.
30. Elias PM, Goerke J, Friend DS. MAMMALIAN EPIDERMAL BARRIER LAYER LIPIDS - COMPOSITION AND INFLUENCE ON STRUCTURE. *Journal of Investigative Dermatology.* 1977;69(6):535-46.
31. Elias PM. Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *Journal of Investigative Dermatology.* 1983;80:S44-S9.
32. McGrath JA. Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australas J Dermatol.* 2008;49(2):67-73; quiz -4.
33. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):751-62.
34. Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y, Inoue S. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Experimental Dermatology.* 2007;16(4):324-30.
35. Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, Sugai M, et al. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci.* 2013.
36. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;127(3):773-U439.
37. Yamashita T, Akamatsu H, Tomitaka A, Ogawa Y, Sugawara N, Matsunaga K. IP-10 in atopic dermatitis. *Allergy.* 2003;58(3):261.
38. De Benedetto A, Slifka MK, Rafaels NM, Kuo IH, Georas SN, Boguniewicz M, et al. Reductions in claudin-1 may enhance susceptibility to herpes simplex virus 1 infections in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;128(1):242-U407.

39. Si Y, Liu S, Liu X, Jacobs JL, Cheng M, Niu Y, et al. A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*. 2012;56(2):507-15.
40. Gao PS. Reductions in claudin-1 may enhance susceptibility to herpes simplex virus 1 infections in atopic dermatitis (vol 128, pg 242, 2011). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(4):903-.
41. Kondoh A, Takano K, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, et al. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(8):861-8.
42. Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S. Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):722-4.
43. Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. MECHANISMS OF DISEASE Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(14):1315-27.
44. Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao YW, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature Genetics*. 2006;38(3):337-42.
45. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(5):1302-5.
46. Elias PM. Stratum corneum defensive functions: An integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125(2):183-200.
47. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 9):1285-94.
48. Harding CR, Scott IR. Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J Mol Biol*. 1983;170(3):651-73.
49. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*. 2004;17 Suppl 1:43-8.
50. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):328-40.
51. Scott IR, Harding CR. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol*. 1986;115(1):84-92.
52. Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M. Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci*. 2003;31(1):29-35.
53. Miajlovic H, Fallon PG, Irvine AD, Foster TJ. Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(6):1184-U182.
54. Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int*. 2011;60(1):1-9.
55. Seguchi T, Chang Yi C, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Archives of Dermatological Research*. 1996;288(8):442-6.
56. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao YW, Liao HH, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*. 2006;38(4):441-6.

57. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, et al. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol*. 2008;128(6):1436-41.
58. Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, Nomura T, Sandilands A, McLean WH, Shimizu H. Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema. *J Invest Dermatol*. 2009;129(3):682-9.
59. Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, et al. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population: a family and case-control study. *J Hum Genet*. 2008;53(7):615-21.
60. McLean WHI, Palmer CNA, Henderson J, Kabesch M, Weidinger S, Irvine AD. Filaggrin variants confer susceptibility to asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(5):1294-5.
61. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(3):661-7.
62. McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):280-91.
63. Gao PS, Rafaels NM, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, Hata T, et al. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):507-13, 13.e1-7.
64. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):150-5.
65. Kezic S, O'Regan GM, Lutter R, Jakasa I, Koster ES, Saunders S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;129(4):1031-U542.
66. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3 Suppl 2):R7-R12.
67. Yuki T, Yoshida H, Akazawa Y, Komiya A, Sugiyama Y, Inoue S. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J Immunol*. 2011;187(6):3230-7.
68. Lee SE, Choi Y, Kim SE, Noh EB, Kim SC. Differential effects of topical corticosteroid and calcineurin inhibitor on the epidermal tight junction. *Exp Dermatol*. 2013;22(1):59-61.
69. Morita K, Miyachi Y, Furuse M. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol*. 2011;21(1):12-7.
70. Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2435-47.
71. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(11):2525-32.
72. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci*. 2013;71(2):89-99.
73. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002;14(5):531-6.
74. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology*. 2002;156(6):1099-111.
75. Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*. 2008;27(55):6930-8.

76. Shang X, Lin X, Alvarez E, Manorek G, Howell SB. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia*. 2012;14(10):974-85.
77. Igawa S, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Takahashi H, Iizuka H, et al. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol*. 2011;20(1):53-7.
78. Yuki T, Hachiya A, Kusaka A, Sriwiriyanont P, Visscher MO, Morita K, et al. Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):744-52.
79. Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM. Contribution of Tight Junction Proteins to Ion, Macromolecule, and Water Barrier in Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2013.
80. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with Ichthyosis: A tight junction disease. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1386-90.
81. Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2013;133(5):1161-9.
82. Padmanabhan P, Dixit NM. Viral kinetics suggests a reconciliation of the disparate observations of the modulation of claudin-1 expression on cells exposed to hepatitis C virus. *PLoS One*. 2012;7(4):e36107.
83. András IE, Toborek M. HIV-1-induced alterations of claudin-5 expression at the blood-brain barrier level. *Methods Mol Biol*. 2011;762:355-70.
84. Che P, Tang H, Li Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*. 2013;446(1-2):303-13.
85. Ishida-Yamamoto A, Kishibe M. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Med Mol Morphol*. 2011;44(1):1-6.
86. Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Order and disorder in corneocyte adhesion. *J Dermatol*. 2011;38(7):645-54.
87. Wertz PW. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato-Venereologica*. 2000;7-11.
88. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(3):261-7.
89. Melnik B, Hollmann J, Plewig G. Decreased Stratum-Corneum Ceramides in Atopic Individuals - A Patho-Biochemical Factor in Xerosis. *British Journal of Dermatology*. 1988;119(4):547-9.
90. Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, Bras W, Portale G, Caspers PJ, et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research*. 2012;53(12):2755-66.
91. Novotný J, Hrabálek A, Vávrová K. Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2301-24.
92. Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol*. 2005;6(4):215-23.
93. HC K, A L, N V, J U, W E, G R. Influence of the pH-value on the growth of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* in continuous culture. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 1992;193(1):78-90.
94. Fluhr J, Jain M, Feingold K, Kao J, Elias P. Generation of free fatty acids from epidermal phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(2):416-.

95. Elias PM. Epidermal Barrier Function - Intercellular Lamellar Lipid Structures, Origin, Composition and Metabolism. *Journal of Controlled Release*. 1991;15(3):199-208.
96. Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2009;9(5):437-46.
97. Murphy JE, Robert C, Kupper TS. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: A crucial link between innate and acquired immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000;114(3):602-8.
98. Feingold KR, Schmuth M, Elias PM. The regulation of permeability barrier homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(7):1574-6.
99. Fluhr JW, Elias PM, Man MQ, Hupe M, Selden C, Sundberg JP, et al. Is the Filaggrin-Histidine-Urocanic Acid Pathway Essential for Stratum Corneum Acidification? *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(8):2141-4.
100. Rippke F, Schreiner V, Doering T, Maibach HI. Stratum corneum pH in atopic dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2004;5(4):217-23.
101. Dahl MV. Staphylococcus aureus and atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. 1983;119(10):840-6.
102. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. *Exp Dermatol*. 2001;10(1):11-8.
103. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-54.
104. Kirschner N, Poetzel C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, et al. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol*. 2009;175(3):1095-106.
105. Kuo IH, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, McGirt LY, Ivanov AI, Barnes KC, et al. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*. 2013;133(4):988-98.
106. Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Eckhart L, Werfel T, et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy*. 2013;68(1):37-47.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo: Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis

DOI: 10.1111/jdv.12753

JEADV

ORIGINAL ARTICLE

Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis

D.I.S. Batista,¹ L. Perez,¹ R.L. Orfali,¹ M.C. Zaniboni,¹ L.P. Samorano,¹ N.V. Pereira,² M.N. Sotto,¹ A.S. Ishizaki,¹ L.M.S. Oliveira,² M.N. Sato,² V. Aoki^{1,*}¹Department of Dermatology, University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil²Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency, University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil

*Correspondence: V. Aoki. E-mail: valeria.aoki@gmail.com

Abstract

Background Atopic dermatitis (AD) in adults and profile of skin barrier proteins and inflammatory cytokines.**Objective** Evaluation of the expression of skin barrier proteins such as filaggrin, claudins 1 and 4 and of circulating inflammatory cytokines (Th1/Th2/Th17) in adults with AD.**Methods** Thirty-three adult patients with AD diagnosed according to the Hanifin & Rajkacriteria, and 25 healthy controls were enrolled in the study. AD severity was measured by Eczema Area and Severity Index (EASI). Laboratory assays included immunohistochemistry analysis of skin barrier proteins, such as filaggrin, claudins 1 and 4 and interleukin-17 (IL-17) from skin samples and determination of circulating cytokine levels (IL-2, 4, 5, 6, 10, 17A, TNF and IFN- γ) by flow cytometry (Cytometric Bead Array).**Results** We observed a reduced expression of filaggrin and claudin 1 in lesional skin of AD patients, when compared to controls. There was an inverse correlation of filaggrin expression and disease severity. In addition, IL-17 expression was enhanced in AD patients. Similarly, higher levels of inflammatory cytokines (IL-2, 5, 6, 10, 17A and IFN- γ) were found in AD patients.**Conclusion** Our data reinforce the role of an altered skin barrier in the pathogenesis of AD. Our results show not only reduced expression of filaggrin and claudin 1 in lesional atopic skin but also inverse correlation of filaggrin expression and disease severity. Moreover, elevation of *in situ* IL-17 and of circulating interleukin levels in AD emphasize the systemic, inflammatory profile of this defective skin barrier dermatosis.

Received: 8 May 2014; Accepted: 13 August 2014

Conflicts of interest

None declared.

Funding sources

FAPESP Grant # 2011/02453-7.

Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, pruritic, inflammatory skin disease most common in early childhood, although up to 40% of the patients remain symptomatic throughout adulthood. AD distribution is worldwide and its prevalence varies, according to age (6–20% in children and 1–3% in adults).^{1,2} AD pathogenesis depends on multiple factors, including environmental, immune, structural and genetic components.^{3,4}

At first, researchers considered AD to be exclusively driven by a primary immunological defect (the so-called 'inside-outside' theory of an intrinsic inflammatory disease); however, recent studies on the skin barrier role in the development of AD corroborate with an 'outside-inside' hypothesis, in which AD is seen as an inherited disease with skin barrier abnormalities.⁵

The barrier dysfunction in AD involves two main components:

(i) Decreased generation of filaggrin (FLG) products that precipitate both structural and functional skin changes, and therefore lead to a higher risk of eczema, asthma, and early-onset of severe, persistent AD; (ii) Tight junction (TJ) defects: Bioelectric epidermal abnormalities, indicative of a reduced level of claudin 1 (CLDN-1).⁵ Previous studies have shown that CLDN-1 deficiency in mice leads to enhanced transepidermal water loss (TEWL).⁶

Some studies suggest that outside-inside initial provocation of AD eventually leads to an outside-inside-outside vicious cycle. One downstream consequence of these barrier defects would be the generation of primary cytokines such as interleukin (IL)-1 α and IL-1 β , which are stored in large quantities in the cytosol of corneocytes. These mediators are the first step in

the cytokine cascade, a primary contributor to inflammation in AD. Sustained antigen entry through a defective barrier leading to a T helper (Th) 2-dominant infiltrate is a second cause of inflammation in AD. Accordingly, correction of the barrier abnormality alone should ameliorate both causes of inflammation in AD.⁶

A classic Th1/Th2 paradigm was previously described in AD, with increased serum IgE levels in 80% of the patients, a biphasic cytokine pattern release with predominance of Th cells expressing IL-4 and IL-13 (Th2 cytokines) in non-lesional skin during the acute phase, and a dominant Th1 profile in the chronic phase (IL-12 and IFN- γ).⁴

However, recent findings in AD and psoriasis changed the exclusive Th1/Th2 paradigm with the discovery of Th17 T cells that synthesize IL-17 and IL-22. Many Th1 diseases have a strong IL-17 signal; in psoriasis, increased number of Th17 cells and enhanced expression of IL-17 contribute to neutrophil chemotaxis and increased expression of antimicrobial peptides.⁷ The precise role of Th17 T cells in AD, however, remains unclear. There is some evidence in animal models of the association of FLG deficiency with Th17-dominated skin inflammation, development of eczematous skin lesions with age and sensitization upon contact with proteins.^{8,9}

Defective skin barrier proteins of atopic individuals may interfere with *in situ* or circulating IL-17. A better understanding of the components of AD pathogenesis and their possible interactions may generate better clues for specific targets in AD therapy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4), and of inflammatory cytokines (Th1/Th2/Th17) in adults with AD.

Methods

Subjects

Thirty-three AD patients were selected (23 males and 10 females, age 18–48 years) and diagnosed according to the Hanifin & Rajka diagnostic criteria.¹⁰ All patients were from the Outpatient Clinic, Department of Dermatology, University of Sao Paulo Medical School. AD severity followed EASI score (range 0–72; 10 mild, 15 moderate and 8 severe).¹¹ None of the patients were treated with corticosteroids (topical or systemic) or immunosuppressants for at least 4 weeks (Table 1).

Twenty-five healthy controls (HC) were also selected (13 males and 12 females, age 23–69 years), without history of skin diseases. All individuals read the informed consent and agreed to participate. The study was approved by the local Ethics Committee. Tissue specimens were obtained by a 4-mm punch biopsy under local anaesthesia.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 4-micra paraffin-embedded samples, as described elsewhere.¹² Table 1 displays the chosen antibody specifications, dilution and detection system.

Quantification of immunolabelled cells

Immunohistochemical stained specimens were scanned using the digital slide scanner Pannoramic Scan - 3DHistech. For IL-17, three dermal areas (each field = 605 μm $\times$ 380 μm) under $\times 200$ magnification were chosen. For filaggrin and claudins, an epidermal section was chosen under $\times 200$ magnification. Photographs were analysed utilizing Image-Pro Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc, Bethesda, MD, USA) for Windows.¹³

Determination of circulating cytokine levels by flow cytometry

Circulating levels of IL-2, 4, 5, 6, 10, 17A, TNF and IFN- γ cytokines were established by flow cytometry utilizing a Human Enhanced Sensitivity Flex Set - Cytometric Bead Array, CBA, (BD Biosciences, CA, USA). The assay was performed following manufacturer's instructions. Briefly, sera samples and cytokine patterns from the set were incubated with capture beads, and recovered with specific antibodies for the respective cytokines. Samples were incubated with Phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies. Acquisition of samples was performed with a flow cytometer (LSRFortessa-BD Biosciences), and the results were obtained by BD FACSArray3.0 (BD Biosciences). Minimum levels of detection were as follows: IL-2: 88.9 fg mL⁻¹; IL-4: 144.4 fg mL⁻¹; IL-5: 67.8 fg mL⁻¹; IL-6: 68.4 fg mL⁻¹; IL-10: 13.7 fg mL⁻¹; IL-17A: 26.1 fg mL⁻¹; TNF: 67.3 fg mL⁻¹; IFN γ : 66.7 fg mL⁻¹.

Statistical analysis

Mann–Whitney and Kruskal–Wallis non-parametric tests were utilized to compare two or three sets of data respectively. Correlation between data was established using Spearman non-parametric

Table 1 Antibody specifications, dilution and detection system utilized in the study

Antibody	Company	Dilution	Detection system
CLDN-1	Zymed® – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA code 51 -9000	1/400	LSAB + System-HRP, code K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA
CLDN-4	NeoMarkers® Fremont, CA, USA cat. RB - 9266 - PO	1/200	LSAB + System-HRP, code K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA
FLG	Novocastra® Newcastle, UK code NCL – filaggrin	1/150	LSAB + System-HRP, code K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA
IL-17	R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA code AF- 317- NA	1/40	LSAB + System-HRP, code K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA

Figure 1 Expression of FLG, CLDN1, CLDN4 and IL-17 in skin specimens from adults with AD tested by immunohistochemistry. (a) Photograph of a skin specimen from a healthy control: FLG, CLDN1 and 4, IL-17 expression (×200). (b) Photograph of a skin specimen from an AD patient: reduced expression of FLG, CLDN1 and 4, and enhanced expression of IL-17 (×200). (c) Expression of FLG (area %), CLDN1 (area %), CLDN4 (area %) and IL-17 (cells/field) in the skin of the healthy control group (HC, n = 33), compared to AD patients (AD, n = 25). (d) Correlation between disease severity (EASI) and skin barrier proteins and IL-17 in the AD group. Line represents arithmetic mean of skin barrier proteins (area %) and IL-17 (cells/field) in skin specimens. **P ≤ 0.01 and ***P ≤ 0.001.

metric correlation test. A difference between groups was considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

Results

Expression of FLG, CLDN1, CLDN4 and IL-17 in skin specimens from adults with AD

Figure 1a shows skin barrier protein and IL-17 expression in skin specimens from HC. In Fig. 1b, we demonstrate the expression of skin barrier proteins and IL-17 in skin specimens from AD individuals. There was a reduced expression of FLG and CLDN1, and an enhanced IL-17 expression in our AD patients, when compared to controls. There was no significant difference in CLDN-4 expression in AD skin. Interestingly, we found an inverse correlation with FLG and disease severity, as shown in Fig. 1d. There was also a positive correlation between the expression of CLDN1 and 4 (data not shown).

Cytokines circulating levels of Th1/Th2/Th17 in adults with AD

With the use of CBA, we observed higher levels of IL-2, 5, 6, 10, 17A and IFN- γ in AD patients when compared to controls (Fig. 2). The inflammatory response in AD showed a mixed Th1/Th2/Th17 profile, with no significant correlation with decreased skin barrier protein expression. Interestingly, we did not observe any correlation between circulating cytokine levels with disease severity, and there was no significant correlation between circulating cytokine levels and the *in situ* expression of the analysed proteins (data not shown).

Discussion

Skin barrier function in AD patients is defective, with increased TEWL, and reduced capacitance. Skin barrier alterations contribute to higher susceptibility to infection (especially by *Staphylococcus aureus* – *S. aureus*) and dysfunctional immune response, consequently leading to intense, uncontrolled pruritus.^{4,14} In addition, keratinocytes release pro-inflammatory cytokines that induce the expression of adhesion molecules on vascular endothelium, facilitating the extravasation of inflammatory cells into skin tissue.⁴

A dysfunctional skin barrier is the result of reduced levels of lipids that form the stratum corneum, filaggrin or claudin defects, altered proteases or trauma from constant scratching in atopic individuals.³ Filaggrin mutations are reported in AD; recently, a study found a TJ defect in North-Americans,³ attributed to claudin 1, therefore corroborating the findings on skin of CLDN-1 knockout murine models.^{3,4}

Our AD patients from Brazil showed reduced expression of FLG and CLDN-1, corroborating results from other populations.^{3,4} We also explored the expression of an additional TJ protein (CLDN-4) in AD individuals. CLDN-4 has been associated with coeliac disease, gluten sensitivity, head and neck carcinomas and infectious diseases, but there was no significant decreased expression in AD individuals.^{15,16}

Even though the majority of patients with AD and FLG mutations outgrow their AD, there are individuals with severe AD who do not have FLG null mutations, and the opposite situation applies. This suggests that a number of additional factors are involved in the development of AD, including other gene

Figure 2 Circulating cytokine levels by flow cytometry. Determination of IL-2, 4, 5, 6, 10, 17A, TNF and IFN- γ serum levels from healthy controls (HC, $n = 25$), atopic dermatitis patients (AD, $n = 24$) were assessed by flow cytometry. Line represents arithmetic mean of cytokine levels expressed in fg mL^{-1} . * $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

mutations and exposure to allergens and microbes. Indeed, skin barrier contributes to IgE sensitization, facilitating the inflammatory response of the atopic skin.^{17,18}

The frequent presence of *S. aureus* in atopic skin and its role in the initiation of acute flares and the perpetuation of the inflammatory chronic response remains a challenge for physicians.^{19,20} Interleukin-17 may have a high clinical impact on the pathogenesis, exacerbation and maintenance of AD. Some authors demonstrate enhanced IL-17 expression in acute, but not chronic lesions of AD skin.²¹ Other studies show an increase in Th17 cells in peripheral blood of AD patients that correlate with disease severity.²² Finally, Niebuhr *et al.*⁷ showed that α -toxins from *S. aureus* induce IL-17 production in Th17 cells from atopic individuals.

We found significantly enhanced expression of *in situ* and circulating levels of IL-17 in AD individuals. However, there was no correlation with reduced expression of FLG and CLDN-1 in AD skin. Therefore, these findings reinforce that AD pathogenesis may have different pathways, either triggered by cytokine release leading to an exacerbation in the inflammatory response, or by a reduced expression of FLG and CLDN-1 defects.

A full understanding of the complex pathogenesis of AD is necessary to discover specific biomarkers and therapeutic targets. In regard to potential AD therapy advances, studies with topical anti-inflammatory agents have shown that inflammation, especially through Th2 cytokines, reduces filaggrin expression.²³ There are reports demonstrating that IL-17A down-regulates the expression of filaggrin and genes important for cellular adhesion, which could affect epidermal barrier formation.²⁴ Therefore, interventions targeting the defective immune response, up-regulation of filaggrin expression, or protein translation process will be of significant impact in patients with barrier defects.²⁵

The reduced expression of filaggrin and claudin 1 in lesional atopic skin, and correlation of decreased filaggrin expression and disease severity strengthen the role of altered skin barrier in the pathogenesis of AD. Moreover, elevation of *in situ* interleukin-17 and of circulating interleukin levels in AD emphasize the systemic, inflammatory profile of this defective skin barrier dermatosis.

References

- Orfali RL, Shimizu MM, Takaoka R *et al.* Atopic dermatitis in adults: clinical and epidemiological considerations. *Rev Assoc Med Bras* 2013; **59**: 270–275.
- Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL *et al.* Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2014; **70**: 338–351.
- De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY *et al.* Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**: 773–786, e1–e7.
- Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int* 2013; **62**: 151–161.
- Wolf R, Wolf D. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2012; **30**: 329–334.
- Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**: 1337–1343.
- Niebuhr M, Gathmann M, Scharnow H *et al.* Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect Immun* 2011; **79**: 1615–1622.
- Oyoshi MK, Murphy GF, Geha RS. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**: 485–493, 93 e1.
- Kuo IH, Yoshida T, De Benedetto A, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 266–278.
- Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1980; **92**(Suppl.): 44–47.
- Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. *Exp Dermatol* 2001; **10**: 11–18.
- Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotio MN. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog* 2011; **50**: 263–267.
- Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *J Med Syst* 2012; **36**: 2621–2631.
- Addor FA, Takaoka R, Rivitti EA, Aoki V. Atopic dermatitis: correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *Int J Dermatol* 2012; **51**: 672–676.
- Nelhubel GA, Karoly B, Szabo B *et al.* The prognostic role of claudins in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2014; **20**: 99–106.
- Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011; **365**: 1315–1327.
- Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A *et al.* Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006; **38**: 337–342.
- Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A *et al.* A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 2009; **41**: 602–608.
- Breuer K, Wittmann M, Kempe K *et al.* Alpha-toxin is produced by skin colonizing *Staphylococcus aureus* and induces a T helper type 1 response in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2005; **35**: 1088–1095.
- Wichmann K, Uter W, Weiss J *et al.* Isolation of alpha-toxin-producing *Staphylococcus aureus* from the skin of highly sensitized adult patients with severe atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2009; **161**: 300–305.
- Toda M, Leung DY, Molet S *et al.* Polarized *in vivo* expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**: 875–881.
- Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2625–2630.
- Jensen JM, Pfeiffer S, Witt M *et al.* Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**(3 Suppl. 2): R19–R28.
- Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M *et al.* IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol* 2012; **21**: 104–110.
- Rowe SM, Clancy JP. Pharmaceuticals targeting nonsense mutations in genetic diseases: progress in development. *BioDrugs* 2009; **23**: 165–174.