Thais Maria Pinheiro Callou

Análise da expressão das proteínas de barreira epitelial, filagrina e claudina-1, na superfície ocular de pacientes portadores de dermatite atópica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título em doutor em Ciências

Programa de Oftalmologia

Orientador: Profa. Dra. Ruth Miyuki Santo

Co-orientador: Profa. Dra. Monique Matsuda

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Callou, Thais Maria Pinheiro
Análise da expressão das proteínas de barreira epitelial, filagrina e claudina-1, na superfície ocular de pacientes portadores de dermatite atópica / Thais Maria Pinheiro Callou. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.
Orientadora: Ruth Miyuki Santo.
Coorientadora: Monique Matsuda.

Descritores: 1.Dermatite atópica 2.Filagrina 3.Claudina-1 4.Epitélio 5.Túnica conjuntiva 6.Imunofluorescência 7.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-374/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais *José Lívio e Bida*, pelo amor incondicional, pelo apoio incessante a minha carreira profissional, por serem meus maiores exemplos de dedicação e firmeza de caráter e a quem serei eternamente grata.

Ao meu esposo *Bruno*, que esteve ao meu lado em todas as etapas da construção desta tese e representou minha fortaleza nas partes mais árduas; com quem pude dividir aprendizados e de quem sempre recebi carinho, compreensão e estímulo.

Ao meu filho *Bernardo*, que faz brotar em mim diariamente um desejo cada vez maior de crescer como ser humano e como profissional.

Aos meus irmãos *Clarice, Eduardo e Romero*, pela certeza de que juntos somos mais fortes, por serem pilares na minha vida.

Aos meus tios *José Luiz e Amélia* e as minhas primas *Natália, Alexandra e Rosa*, que vibraram com cada conquista e que significaram um porto seguro na minha trajetória em São Paulo.

Ao meu avô *Antônio Lyrio Callou* (*in memorian*), que me deixou o grande legado de ingressar na carreira acadêmica.

Agradecimentos

À minha orientadora Doutora **Ruth Miyuki Santo**, ilustre Professora do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com quem tive a honra de conviver e aprender a cada dia, pela confiança que em mim depositou, pelos ensinamentos e sobretudo, pelo exemplo de lisura e dedicação.

Ao Professor Dr. **Mario Luiz Ribeiro Monteiro**, coordenador da Pós-Graduação na área de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido como aluna no programa de pós-graduação e pelo exemplo de competência.

À minha co-orientadora Dra. **Monique Matsuda**, bióloga e pesquisadora do Laboratório de Investigação em Oftalmologia – LIM 33, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações técnicas sobre a metodologia da análise gênica, pela apoio e carinho que recebi na rotina do laboratório.

À Dra. **Mirian Nacagami Sotto**, Professora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela valiosa contribuição na construção da metodologia deste estudo, pelo apoio que recebi na análise das lâminas.

À Dra. **Naiura V. Pereira**, do Laboratório de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações técnicas sobre a metodologia de imunofluorescência, pela sua disponibilidade, paciência e dedicação a este estudo.

À Dra. **Raquel Leão Orfali**, médica assistente do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sua disponibilidade em contribuir com este estudo e pelo apoio no desenvolvimento do texto para as publicações.

À minha companheira da pós-graduação Dra. **Natália Torres Giacomin**, pela cumplicidade, amizade e apoio em todos os momentos.

À **Ana Paula Scheidecker**, minha querida Aninha, ilustre bibliotecária do Departamento de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, pela sua valiosa companhia em todos os momentos, por torcer pelos meus melhores resultados e pelo apoio e carinho que me foram fundamentais.

À **Regina Ferreira de Almeida**, ilustre secretária do programa de Pós-graduação do Departamento de Oftalmologia da Universidade São Paulo, por fazer muito além do seu trabalho para que tudo ocorresse bem, pela atenção e dedicação ao meu projeto.

Aos pacientes participantes deste estudo, pela colaboração, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelies e 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da Vinci)

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de sinais
Lista de quadros e figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1. Dermatite Atópica.....1
1.2. Manifestações Oculares na DA.....4
1.3. Filagrina e Claudinas na barreira cutânea.....5
1.4. Filagrina e Claudinas na barreira ocular.....7
2. OBJETIVOS.....10
2.1. Gerais.....10
2.2. Específicos.....10
3. MÉTODOS.....12
3.1. Desenho do estudo.....12
3.2. Cálculo da amostra.....12
3.3. Seleção dos pacientes.....13
3.4. Avaliação oftalmológica.....14
3.5. Citologia de impressão.....17
3.6. Imunofluorescência.....19
3.7. Análise gênica.....21
3.7.1. Extração de RNA total das células coletadas pela citologia de impressão.....21
3.7.2. Reação de transcriptase reversa.....22
3.7.3. PCR em tempo real.....22
3.7.4. Curvas-padrão dos genes alvo.....23
3.8. Análise estatística.....24
4. RESULTADOS.....27
4.1. Dados demográficos.....27
4.2. Sintomas.....28
4.3. Avaliação oftalmológica.....29
4.4. Avaliação da superfície ocular.....31
4.5. Avaliação da expressão das proteínas FLG e CLD nas células epiteliais da conjuntiva, nos pacientes com DA e controles, pela análise de IF.....32
4.6. Avaliação da expressão dos transcritos de RNAm das proteínas FLG e CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva, nos pacientes com DA e controles, pela análise de RT-PCR.....34
4.7. Correlação entre as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm e o quadro clínico ocular (caraterísticas oculares e testes clínicos para avaliação da superfície ocular), sintomas e gravidade da DA.....35
5. DISCUSSÃO.....43
6. CONCLUSÕES.....49
7. ANEXOS.....51
7.1 Parecer de aprovação do comitê de ética e pesquisa.....51
7.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....53
7.3. Ficha de avaliação.....56
7.4. OSDI.....59
8. REFERÊNCIAS.....59

Apêndices
Apêndice A. Apresentações em Congressos
- ARVO *(Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. Baltimore, Maryland, United States. Analysis of the ocular surface of patients with atopic dermatitis: filaggrin and claudin-1 proteins profile.*
- ISAD *(International Symposium on Atopic Dermatitis. Sao Paulo)*. *Ocular surface profile in patients with atopic dermatitis.*
Apêndice B. Publicações submetidas
- *Atopic dermatitis beyond the skin – a review on the ocular surface epithelial barrier. Clinics Journal*.
- *Analysis of the ocular surface of patients with atopic dermatitis discloses increased expression of filaggrin and claudin-1,key components of the epithelial barrier. The Ocular Surface.*

Listas

BSA	Da língua inglesa, *bovine serum albumin*, soroalbumina bovina
CCA	Ceratoconjuntivite atópica
cDNA	DNA complementar
CLD1	Claudina-1
CLD4	Claudina-4
CLDs	Claudinas
CT	Controle
DA	Dermatite atópica
DP	Desvio padrão
EASI	Da língua inglesa: *Eczema Area and Severity Index,* índice de gravidade por área de eczema
EC	Estrato córneo
FLG	Filagrina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de confiança
IF	Imunofluorescência
IgE	Imunoglobulina (Ig) do isotipo epsilon (E). Produzida por plasmócitos com auxílio de linfócitos T auxiliadores tipo 2 (Th2)
LIM	Laboratório de Investigação Médica

OSDI	Da língua inglesa: *Ocular Surface Disease Index,* índice de doença de superfície ocular
p	Significância estatística
PBS-T	Da língua inglesa: *Phosphate Buffered Saline -Tween*, tampão fosfato salino
RT-PCR	Da língua inglesa: *real-time polymerase chain reaction,* reação em cadeia de polimerase
RNAm	RNA mensageiro
TJ	Da língua inglesa: *Tight Junctions*, junções apertadas
TRFL	Tempo de ruptura do filme lacrimal

=	Igual
>	Maior que
±	Mais ou menos
<	Menor que
%	Porcentagem

Quadro 1 - Critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka.....3

Figura 1- Avaliação da superfície ocular com os corantes vitais..... 16

Figura 2 - Fragmento da membrana de nitrocelulose utilizado na citologia de impressão 18

Figura 3 - Diagrama com área de delimitação sobre a lâmina..... 18

Figura 4 - Localização da coleta com os fragmentos da membrana de nitrocelulose sobre a conjuntiva bulbar inferior 19

Figura 5 - Pannoramic Scan 21

Figura 6 - Curvas-padrão de RT-PCR para os genes de interesse e endógeno a partir do pool das amostras de cDNA 24

Figura 7 – Lâminas de IF e representação gráfica da expressão aumentada da FLG e CLD1 na superfície ocular de pacientes com DA em relação aos controles. 33

Figura 8 – Representação gráfica da expressão aumentada dos genes FLG e CLD1 nos pacientes com DA em relação aos controles 34

Tabela 1 - Dados demográficos segundo grupos e resultados dos testes estatísticos.... 27

Tabela 2 - Descrição dos sintomas avaliados segundo grupos e resultado dos testes estatísticos 28

Tabela 3 - Características oculares avaliadas segundo grupos e resultados dos testes estatísticos 30

Tabela 4 - Testes clínicos para avaliação da superfície ocular segundo grupos e resultados dos testes estatísticos..... 31

Tabela 5 - Descrição da expressão da proteína FLG pela análise de IF nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares 36

Tabela 6 - Descrição da expressão da proteína CLD1 pela análise de IF nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares 37

Tabela 7 - Descrição dos transcritos de RNAm da FLG nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares..... 38

Tabela 8 - Descrição dos transcritos de RNAm da CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares..... 39

Tabela 9 - Correlação entre a gravidade da DA (EASI e níveis de IgE), testes clínicos de avaliação da superfície ocular (OSDI, corantes fluoresceína e rosa Bengala; TRFL e teste de Schirmer I) e sintomas oculares e a expressão das proteínas FLG e CLD1, e seus transcritos de RNAm 40

Resumo

Callou TMP. *Análise da expressão das proteínas de barreira epitelial, filagrina e claudina-1, na superfície ocular de pacientes portadores de dermatite atópica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica, pruriginosa, que acomete crianças e adultos e apresenta alta prevalência mundial. Em geral, a DA está associada a manifestações extra-cutâneas de atopia como asma, rinite e manifestações oculares que podem acarretar danos visuais irreversíveis. A patogênese da DA é multifatorial, incluindo componentes ambientais, imunológicos, estruturais e genéticos. A diminuição das proteínas filagrina (FLG) e claudina-1 (CLD1) na barreira cutânea dos pacientes portadores de DA é um dos principais fatores estruturais envolvidos na gênese da doença. É possível que a alteração dessas proteínas na superfície ocular de pacientes portadores de DA possa contribuir para a gênese das alterações oculares. **Objetivos**: Avaliar o perfil das proteínas FLG e CLD1 e determinar a expressão do RNA-m para seus genes na superfície ocular dos pacientes portadores de DA, e correlacionar os resultados com o quadro clínico ocular, sintomas e gravidade da doença. **Métodos**: Células da conjuntiva bulbar dos pacientes foram coletadas por citologia de impressão e avaliadas pelas técnicas de imunofluorescência (IF) e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR). **Resultados:** Detectamos aumento da expressão da FLG e da CLD1, bem como dos seus níveis de transcritos de RNAm na superfície ocular nos pacientes com DA comparados aos controles. Houve correlação negativa com a coloração com fluoresceína e correlação positiva e significativa entre a expressão da FLG e o TRFL. **Conclusões:** No presente estudo, as células epiteliais conjuntivais de pacientes com DA apresentaram expressão aumentada de FLG e CLD1, tanto na IF quanto no RT-PCR, em contraste com os achados cutâneos relacionados. Nossos resultados podem refletir uma resposta protetora da superfície ocular à inflamação ocular relacionada à DA e à doença do olho seco associada. Também detectamos FLG na conjuntiva de indivíduos saudáveis, um achado sem precedentes. Investigações adicionais com enfoque no papel da FLG, CLD1 e outras proteínas epiteliais na superfície ocular de pacientes com DA podem esclarecer a fisiopatologia da doença e ajudar a desenvolver terapias eficazes.

Descritores: Dermatite atópica; Filagrina; Claudina-1; Epitélio; Túnica conjuntiva; Imunofluorescência; Reação em cadeia da polimerase.

Abstract

Callou TMP. *Analysis of epithelial barrier proteins expression, filaggrin and claudin-1, on the ocular surface of patients with atopic dermatitis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronic, itchy inflammatory disease that affects children and adults and presents a high global prevalence. In general, AD is associated with extra-cutaneous manifestations of atopy such as asthma, rhinitis and ocular involvement that can lead to irreversible visual damage. The pathogenesis of AD is multifactorial, including environmental, immunological, structural and genetic components. The reduction of filaggrin (FLG) and claudin-1 (CLD1) proteins in the cutaneous barrier of patients with AD is one of the main structural factors involved in the genesis of the disease. It is possible that the alteration of these proteins in the ocular surface of patients with AD may contribute to the genesis of ocular involvement. **Purpose**: To evaluate FLG and CLD1 profiles and determine mRNA expression for their genes on the ocular surface of AD patients, correlating the results with the ocular findings, symptoms and disease severity. **Methods**: Impression cytology was performed on the patients' bulbar conjunctiva for cellular collection and subsequent evaluation through immunofluorescence (IF) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques. **Results**: We detected increased expression of FLG and CLD1, as well as their transcript levels in AD patients compared to controls. There was a negative correlation with fluorescein staining and positive and significant correlation between TBUT and FLG expression. **Conclusions**: In the present study, conjunctival epithelial cells of AD patients showed an increased expression of FLG and CLD1, on both IF and RT-PCR, in contrast to related cutaneous findings. Our results may reflect a protective response of the ocular surface to AD-related ocular inflammation and associated dry eye disease. We also detected FLG in the conjunctiva of healthy individuals, an unprecedented finding. Further investigations focusing the role of FLG, CLD1 and other epithelial proteins in ocular surface of AD patients may clarify the pathophysiology of the disease and help develop effective therapies.

Descriptors: Dermatitis, atopic; Filaggrin; Claudin-1; Epithelium; Conjunctiva; Immunofluorescence; Polymerase chain reaction.

1. Introdução

1.1. Dermatite Atópica

A dermatite atópica (DA), também conhecida apenas por eczema ou eczema atópico é uma doença cutânea inflamatória e, caracteristicamente, pruriginosa.[1] Atualmente, é uma das desordens da pele não transmissíveis mais comuns e sua prevalência vem crescendo em países desenvolvidos, afetando até 30 % das crianças e 10 % dos adultos.[2, 3] A DA tem início principalmente na infância e, em casos mais graves, mantém-se na idade adulta.[4] Por apresentar curso crônico e redicivante, essa doença afeta significativamente a qualidade de vida dos doentes e das suas famílias, resultando em elevado impacto socioeconômico.[5, 6]

A patogênese da DA é multifatorial, incluindo componentes imunológicos, estruturais, ambientais e genéticos.[7, 8] **Componente imunológico**. O sistema imune dos pacientes com DA apresenta uma desregulação, com hiperativação da resposta Th2 e consequente aumento na produção da imunoglobulina E (IgE) sérica e de mediadores celulares inflamatórios que estão intimamente envolvidos com o prurido, principal sintoma da doença, e a manutenção das lesões cutâneas, características da DA. Os linfócitos do tipo Th2 são predominantes na fase aguda, assim como as células Th1 estão relacionadas ao estagio crônico da doença, com a colaboração das células Th22 e Th17.[9, 10] **Componente estrutural**. A pele dos pacientes com DA apresenta uma disfunção estrutural na epiderme, devido à diminuição de proteínas com função de barreira como as claudinas (CLDs), principalmente CLD1 e CLD4, e a filagrina (FLG).[11, 12] **Componente ambiental.** Somado ao fator imunológico, esse desequilíbrio na homeostase epidérmica faz com que os pacientes com DA apresentem maior contato e respondam fortemente aos alérgenos (poluentes, irritantes químicos, pólen) e microorganismos do meio externo gerando sensibilização e exacerbação da inflamação.[13] Além disso, o microbioma da pele desses pacientes é alterado,[14] com maior susceptibilidade a infecções oportunistas

por agentes como *Staphylococcus aureus* e herpes simples.[15-17] A temperatura e a umidade atmosférica também são fatores influenciadores.[18] Ambientes urbanos, sabidamente poluídos, apresentam maior prevalência de DA.[19, 20] **Componente genético**. A predisposição genética, na DA, é alta, mais de 70% em gêmeos monozigóticos.[21] Sabe-se também que existem mutações genéticas associadas ao desenvolvimento da DA. A mutação do gene da FLG é a mais associada.[22] Essa mutação também está ligada ao início mais precoce e a quadros mais graves de DA.[23, 24]

Não há marcador patognomônico para DA. O diagnóstico é feito clinicamente e é baseado na história pessoal e familiar de hipersensibilidades, asma e rinite; na morfologia, cronicidade e distribuição das lesões na pele e na associação com outros sinais clínicos.[4] Os critérios Hanifin e Rajka[25] são os mais utilizados até hoje[26] e compreendem critérios maiores e menores. É necessária a presença de pelo menos três critérios maiores e três critérios menores para o diagnóstico da doença, conforme o Quadro 1.[25] Entre os critérios menores, um terço compreende alterações oculares.

Quadro 1 - Critérios diagnósticos de Hanifin e Rajka.

Critérios Maiores:	Critérios Menores:
Prurido Erupção na face e /ou superfície extensora em crianças menores e lactentes Liquenificação nas áreas flexurais em crianças maiores Tendência a cronicidade ou recorrências crônicas História pessoal ou familiar de manifestações de atopia: asma, rinite, dermatite atópica	Xerose cutânea Prega de Dennie-Morgan (linha acentuada na pálpebra inferior) Escurecimento ao redor dos olhos Palidez facial Pitiríase alba Queratose pilar Ictiose vulgar Hiperlinearidade palmar e plantar Dermografismo branco (linha branca aparece na pele dentro de um minuto, após a pele ser friccionada com um objeto) Conjuntivite, ceratocone, catarata anterior subcapsular Elevação da IgE sérica Reatividade ao teste cutâneo imediato

Adaptado de Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 1980; 92 (Suppl.): 44–47

1.2. Manifestações oculares na DA

Outras formas de hipersensibilidades são comuns nos pacientes portadores de DA, como asma, alergias alimentares,[27] rinites e conjuntivites alérgicas[28] e o quadro clínico se torna ainda mais grave quando há outras comorbidades tais como: infecções cutâneas[29] e extracutâneas, condições neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade[30], transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH),[31] doenças autoimunes,[32] câncer,[33] obesidade,[34] distúrbios cardiovasculares[35] e envolvimento ocular.[36] Embora mais estudos sejam necessários para comprovar a associação da DA com a maioria das comorbidades citadas, em relação ao quadro ocular, os estudos são consistentes e demonstram risco de perda visual, se não identificados e tratados.[37]

Aproximadamente 40% dos indivíduos portadores de DA apresentam acometimento ocular.[38] Esse envolvimento ocular ocorre principalmente nos adultos, pode ocorrer em qualquer etapa do curso da DA, não apresentando relação direta com o quadro cutâneo, pode ser agudo ou crônico,[39] e em casos de maior gravidade, envolve todo aparelho ocular, desde a pele palpebral até estruturas intraoculares, como a seguir: escurecimento da pele periorbital (sinal do olho de panda) e perda lateral dos supercílios (sinal de Hertoghe); pálpebras: descamação, espessamento, edema, fissuras, linhas extras (linhas de Dennie-Morgan), ectrópio, entrópio, ptose e maior prevalência de blefarites estafilocócicas; cílios: triquíase; filme lacrimal: instabilidade do filme lacrimal e ocorrência de síndrome olho seco; conjuntiva: quemose, hipertrofia papilar, fibrose e queratinização patológica, atrofias e simbléfaro; limbo: nódulos de Horner-Trantas e neovascularização; córnea: ceratopatia ponteada superficial e ceratite epitelial, defeitos epiteliais persistentes, *pannus*, opacidades estromais, aumento da incidência de ceratocone; íris: irite; cristalino: catarata; úvea: uveíte; nervo óptico: glaucoma; retina: descolamento de retina.[40-44]

A produção lacrimal desses pacientes também pode ser afetada pelo uso crônico de medicações anti-histamínicas, importantes no tratamento da DA.[45] Há também relatos de neoplasias escamosas superficiais, possivelmente, em decorrência do uso de imunossupressores sistêmicos.[46] Há aumento na incidência do glaucoma, pelo uso de corticoides por longo prazo, porém atualmente, autores sugerem um glaucoma típico da DA.[47] Esses pacientes também apresentam maiores incidências de ceratites infecciosas, principalmente por *Staphyloccocus aureus* e Herpes simples.[48, 49] Em relação às conjuntivites, os pacientes com DA podem apresentar vários subtipos incluindo a sazonal e perene, papilar gigante e as ceratoconjuntivites vernal e atópica.[41]

A chamada ceratoconjuntivite atópica (CCA), descrita por Hogan em 1953,[50] é uma doença ocular inflamatória, típica de pacientes com DA. Os sintomas frequentemente relacionados à CCA são: baixa visual, prurido ocular, fotofobia e lacrimejamento. A CCA tem inicio tradicionalmente no final da adolescência e inicio da vida adulta,[51] embora tenham sido descritos vários casos em crianças.[52] Entre as demais conjuntivites alérgicas, a CCA tem maior gravidade pois acomete progressivamente a conjuntiva e a córnea dos pacientes, podendo persistir por toda a vida, representando uma potencial causa de cegueira nesse grupo.[37]

1.3. FLG e CLD1 na barreira cutânea

A pele, juntamente com as mucosas, forma um extenso complexo de proteção e manutenção da homeostase corpórea, através da formação de barreira física e de portões de permeabilidade especializados. Entre as suas funções, destacam-se a termorregulação, proteção contra desidratação e traumas, excreção de substâncias, proteção contra os raios UV e ação imunitária, que impede a penetração de microrganismos.[53] Na sua estrutura,

a pele possui dois conjuntos proteicos essenciais para seu perfeito funcionamento: FLGs e CLDs e seus defeitos vêm sendo associados à gênese da DA.[12]

A epiderme, camada mais externa da pele, é composta por epitélio estratificado, pavimentoso e queratinizado, apresenta os queratinócitos como suas principais células e é formado por cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e camada córnea, a mais externa.[54] O estrato córneo (EC) constitui a primeira barreira de proteção do tecido cutâneo, afastando substâncias e microrganismos nocivos. As células basais apresentam intensa mitose e poucos grânulos de queratina. À medida que se locomovem para a superfície essas células vão aumentando seu número de filamentos queratina.[55] No nível molecular, esse envelope cornificado é formado por proteínas com funções altamente especificas para cada etapa, entre elas a FLG.[56]

A FLG localiza-se no citoplasma dos queratinócitos e tem a função de agregar os filamentos de queratina para formação e organização do EC.[56, 57] A FLG é também essencial para a hidratação dessa camada, uma vez que é precursora dos aminoácidos e de outros derivados conhecidos no seu conjunto pelo fator emoliente natural, que impede a perda de fluidos vitais, além de contribuir para regulação do pH da pele, reduzindo-o.[58] Esse processo de queratinizacão ou cornificação, no qual a FLG tem papel fundamental, é essencial para que a pele desempenhe suas funções.[54]

Sabe-se que na pele dos pacientes com DA, há diminuição da FLG.[12] Vários estudos demostraram, nos últimos anos, que a mutação no gene da FLG está associada ao desenvolvimento de características de atopia, incluindo a DA.[23, 59-62] Atualmente, essas mutações representam o maior fator de risco para desenvolvimento da DA,[59] estão presentes nos casos de maior gravidade,[63] além de estarem relacionados a maior risco de início precoce da DA e maior chance de persistência da DA na idade adulta.[64]

Internamente ao EC, a camada granulosa constitui a segunda barreira de proteção da pele ao meio externo. Nessa camada, concentram-se os complexos de oclusão ou *tight junctions* (TJ), conjunto de proteínas que garantem função não só de barreira mecânica (selagem celular), como também de permeabilidade celular e polaridade (difusão paracelular de fluidos, moléculas e íons), além de agirem como plataformas de sinalização, gerando expressões de proteínas específicas e garantindo especificidade de cada tecido.[65, 66]

Entre as TJ, a família das proteínas transmembranas CLDs, que possui 27 membros, e é amplamente estudada.[67] Na epiderme, a CLD1 e a CLD4 são essenciais no processo de diferenciação e queratinização das células da camada basal até o EC.[68] A redução nessas CLDNs está associada à patogênese da DA e outras doenças cutâneas.[12, 69, 70]

Com a diminuição da FLG e da CLD1, os pacientes apresentam falhas na sua barreira de proteção cutânea, consequentemente maior contato com alérgenos e microorganismos, propensão a xerose, alterações de pH, alterações da sua flora e maior chance de infecções recorrentes.[71]

1.4. FLG e CLD1 na barreira ocular

Assim como na pele, os epitélios da córnea e da conjuntiva formam uma a barreira que protege o olho dos agentes externos. Além disso, a mucosa ocular também regula o trânsito de fluido, eletrólitos e macromoléculas. [72]

Como já mencionado, a FLG tem como uma das suas principais funções, organizar o processo de queratinização. Em condições normais, a mucosa conjuntival apresenta epitélio estratificado não queratinizado.[73] Mesmo diante dessa informação, autores pesquisaram a presença da FLG na conjuntiva de indivíduos sadios e a proteína

não foi encontrada.[74] Por outro lado, os pacientes portadores de DA podem apresentar quadros de conjuntivites, blefarites, ceratites e outras manifestações oculares que, cronicamente, alteraram a estrutura da conjuntiva.[75]

Em relação às CLDs, dos 27 subtipos da proteína, os subtipos 1, 4, 7 e 10 estão presentes na conjuntiva compondo a barreira de proteção ocular.[76] O subtipo 1 também faz parte da barreira de proteção epitelial da pele em indivíduos normais e sua diminuição está relacionada a DA.[11, 12] Entretanto, não existem trabalhos demostrando se também ocorrem alterações na CLD1 na superfície ocular de indivíduos com DA.

É possível que mudanças no perfil da FLG e da CLD1 na superfície ocular de pacientes portadores de DA possam contribuir para a gênese das alterações oculares frequentes nesse grupo. O conhecimento das estruturas formadoras da barreira de proteção do epitélio conjuntival é fundamental para a melhor compreensão da fisiopatologia das doenças que acometem a superfície ocular, incluindo a DA.

2. Objetivos

2.1. Geral

Analisar as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm na superfície ocular de pacientes com DA, comparando com pacientes sem DA.

2.2. Específicos

a. Correlacionar as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm com o quadro clínico ocular nos pacientes com DA.

b. Correlacionar as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm com os sintomas oculares nos pacientes com DA.

c. Correlacionar as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm com a gravidade da doença nos pacientes com DA.

3. Métodos

3.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal e comparativo entre dois grupos de pacientes: pacientes portadores de DA e grupo-controle formado por pacientes sem DA.

A amostra do estudo é aleatória simples. A unidade do estudo é o olho, que são independentes um do outro.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de pesquisa número 1.291.315 (Anexo 1).

3.2. Cálculo de amostra

O estudo piloto mostrou que na análise do perfil das proteínas CLD1 e FLG pela imunofluorescência houve uma média de 1,56 de diferença na FLG entre pacientes com DA e controle, com variabilidade máxima de 1,64 (DP = 1,64). Supondo que os resultados obtidos no estudo piloto permaneçam, com 95% de intervalo de confiança (IC) e 80% de poder, a amostra necessária para a realização do estudo é de 17 pessoas em cada grupo com base no teste bicaudal. Os cálculos para análise da CLD1 geraram uma amostra menor que 17, assim como os cálculos para realização da análise gênica para ambas as proteínas.

3.3. Seleção dos pacientes

- Grupo 1: Pacientes com DA

O diagnóstico da doença foi estabelecido de acordo com os critérios de Hanifin & Rajka (Quadro 1) no ambulatório de Dermatologia do HC-FMUSP e a classificação da DA de acordo com a pontuação EASI. O EASI, Índice de Gravidade do Eczema por Área (*Eczema Area and Severity Index*) foi desenvolvido por Hanifin et al.[77] e afere a gravidade da dermatose baseando-se na associação entre a presença de sinais clínicos, eritema, pápulas, escoriação e liquenificação, e a área de superfície corpórea acometida. A pontuação pode variar de 0 a 72, apresentando correlação entre uma maior pontuação e a gravidade da doença. A gravidade da DA foi classificada em leve (0-23) e moderada/grave (24-72). A dosagem sérica do IgE também foi realizada no ambulatório de Dermatologia pelo método nefelométrico (N latex IgE mono; Dade Behring, Marburg, Alemanha). Níveis normais foram considerados até 100 UI/mL.[78]

Os critérios de inclusão adotados por este estudo foram:

- Adultos com diagnóstico de DA;
- Interesse e disponibilidade do paciente em participar do estudo proposto;

Os critérios de exclusão adotados para este estudo foram:

- Uso de colírio ou pomada ocular por pelo menos 4 semanas;
- Presença de infecção ocular;
- Presença de lesões na superfície ocular não características da CCA;
- Antecedentes oculares de uveíte ou uveíte ativa;
- Diagnóstico de glaucoma;
- Gravidez ou lactação;
- Uso de imunomoduladores sistêmicos;

- Falta de disponibilidade em participar da pesquisa.

Todos os pacientes faziam uso de anti-histamínicos via oral e/ou cremes tópicos dermatológicos para hidratação. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), concordando em participar do estudo e o paciente era livre para retirar-se a qualquer momento.

- Grupo 2: Grupo-controle composto por pacientes sem DA

O grupo controle foi formado por acompanhantes, não familiares, dos pacientes. Esses indivíduos não apresentavam risco de DA ou qualquer outra doença na superfície ocular.

O exame oftalmológico dos indivíduos incluídos no estudo e a coleta das células da conjuntiva pela técnica de citologia de impressão foram realizados no Ambulatório de Oftalmologia do HC-FMUSP; as análises de imunofluorescência foram executadas no Laboratório de Dermatologia, FMUSP; a digitalização das lâminas foi feitas na Sala de Imagem do Departamento de Patologia, FMUSP e as análises gênicas foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica do Departamento de Oftalmologia - LIM 33, FMUSP.

3.4. Avaliação oftalmológica

Os pacientes foram avaliados pela mesma examinadora (TMPC) e submetidos aos seguintes exames (Anexo 3):

1. Acuidade visual, com correção, utilizando a Tabela de Snellen e distância padrão de 6 metros.

2. Avaliação das estruturas oculares e anexos pela biomicroscopia à lâmpada de fenda:

Descamação das pálpebras (0=ausência, 1=presença); linhas extras nas pálpebras (0=ausência, 1=presença); ectrópio (0=ausência,1= presença), ptose palpebral (0=ausência,1= presença), perda lateral dos supercílios (0=ausência,1= presença), fissuras palpebrais (0=ausência,1= presença), escurecimento da pele periorbital (0=ausência,1= presença), hiperemia da conjuntiva (0=ausência, 1=presença); presença de hipertrofia papilar em conjuntiva tarsal (0=ausência,1= presença); neovascularização da córnea (0=ausência, 1=presença); opacidade em córnea (0=ausência, 1=presença); catarata (0=ausência,1= presença); outros achados como transplante de córnea (0=ausência,1= presença) e ceratocone (0=ausência,1= presença).

3. Avaliação dos sintomas oculares. Todos os pacientes foram interrogados pelo autor sobre a presença de prurido nos olhos, pruridos nas pálpebras, fotofobia e lacrimejamento. Estas queixas foram graduadas em escala de 0 (ausente) a 5 (intenso) pelo paciente de acordo com a intensidade dos sintomas. Os pacientes também responderam ao questionário OSDI (*Ocular Surface Disease Index)* traduzido e adaptado para a língua portuguesa. A escala do questionário varia de 0 a 100, com valores maiores indicando maior gravidade da doença na superfície ocular[79] (Anexo 4).

4. Avaliação da superfície ocular com os corantes vitais: rosa Bengala e fluoresceína. O exame foi pontuado de 0 (mínima) a 9 (máxima), de acordo com a classificação de van Bijsterveld.[80] Para avaliação com a fluoresceína, a superfície da córnea foi dividida horizontalmente em 3 partes e cada 1/3 recebia pontuação de 0 a 3 (0= sem coloração, 1= coloração ponteada leve, 2= coloração ponteada moderada e 3= coloração ponteada intensa/confluente) (Figura 1).

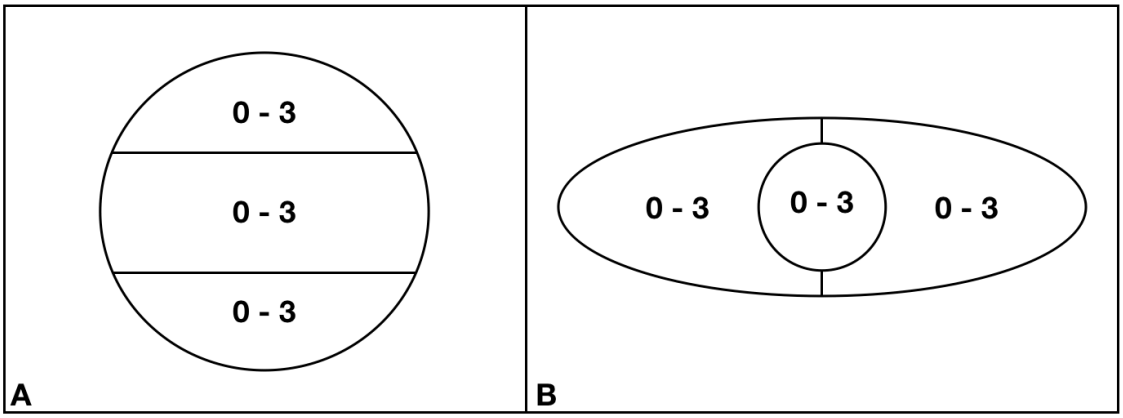


Figura 1- Avaliação da superfície ocular com os corantes vitais A. fluoresceína; **B.** rosa Bengala

5. Tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL): medida do tempo entre o piscar e o aparecimento da primeira área seca na córnea. Este exame foi quantificado em segundos, após o paciente piscar 3 vezes. Foi obtida a média de três medidas subsequentes. Valores superiores a 10 segundos foram considerados normais.[81, 82]

6. Teste de Schirmer I: com papel de filtro Whatman 41 (Ophthalmos® – São Paulo – Brasil) sem instilação de anestésico. Os pacientes permaneceram com os olhos fechados

durante o exame. Após 5 minutos, o papel de filtro foi retirado e a extensão da coluna úmida no papel foi medida em milímetros. Valores maiores que 10 mm foram considerados normais.[81]

3.5. Citologia de impressão

Fragmentos de membrana de nitrocelulose pura (MF - Membrane Filters 0.45 μm, Merck Millipore, Ireland) medindo 7 mm por 5 mm foram utilizados para obtenção das células da superfície ocular. Um recorte no lado esquerdo de cada fragmento foi realizado conforme a Figura 2. Após instilação de uma gota de colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína a 0,5%, Alcon, São Paulo, Brazil) e com auxílio de pinça romba, o fragmento foi colocado sobre a conjuntiva bulbar inferior dos pacientes. A membrana de nitrocelulose aplicada sobre a conjuntiva foi pressionada utilizando-se o dorso da pinça, com movimentos lineares, leves e repetidos com o intuito de aumentar a aderência sobre a conjuntiva, por 10 segundos, e retirada em seguida. A operação era repetida se membrana ficasse úmida. Essa membrana contendo as células foi pressionada sobre uma lâmina de vidro silanizada e então retirada. Durante todo o manuseio, a extremidade recortada da membrana permaneceu sempre à esquerda da examinadora, com intuito de padronizar a obtenção da amostra. Foi utilizado sempre o mesmo diagrama para delimitação da área sobre a lâmina que receberia a membrana contendo as células (Figura 3). As células aderidas à lâmina foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4%. As lâminas foram preservadas em PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4 até o processamento e análise.

Para a realização do RT-PCR, a membrana contendo as células foi armazenada em Eppendorf com solução de RNA later (Qiagen,Valencia, CA, USA).

Toda a operação foi realizada nos olhos direito e esquerdo. Três fragmentos foram utilizados na conjuntiva bulbar inferior em cada olho, seguindo a sequência: conjuntival nasal, intermediária e temporal para as análises, respectivamente, da IF da CLD1, da FLG e análise gênica (RT-PCR) de ambas as proteínas (Figura 4).

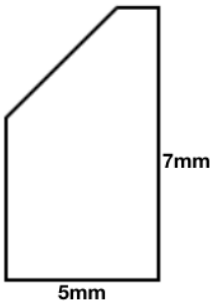


Figura 2 - Fragmento da membrana de nitrocelulose utilizado na citologia de impressão

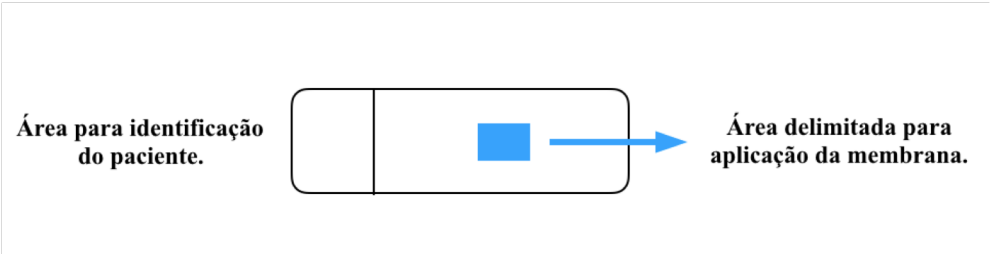


Figura 3 - Diagrama com área de delimitação sobre a lâmina

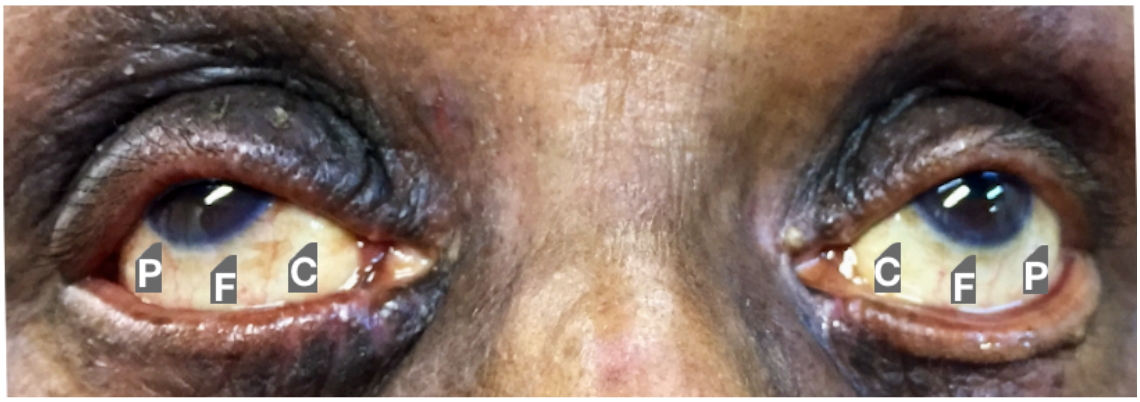


Figura 4 - Localização da coleta com os fragmentos da membrana de nitrocelulose sobre a conjuntiva bulbar inferior P = RT-PCR; F = FLG; C = CLD1

3.6. Imunofluorescência

As lâminas armazenadas foram lavadas com PBS duas vezes. Utilizou-se 1 % de Triton X – 100 (cód. X100-500ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS-Tween (PBS-T) (0,1 % de T 20 em PBS) durante dois minutos para permeabilização celular. Realizado novo enxague com PBS-T. As lâminas ficaram uma hora em solução de bloqueio composta por 2 % de albumina de soro bovina (BSA), 5 % de soro fetal bovino (FCS) em PBS-T (esterilizado por filtração e armazenado a -20 ° C). Em seguida, foi realizado novo enxague com PBS-T. O anticorpo primário em 0,5 % de BSA (em PBS-T), overnight a 4 ° C , foi adicionado nas seguintes concentrações: FLG (Anti-filagrina cód. NCL-Filagrin, Leica, New Castle Upon Tyne, UK) 1:25 e Claudina-1 (Anti-claudina-1 cód. 51-9000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1:50. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS-T por cinco minutos. Foram adicionados o fluoróforo e DAPI (Dihydroethidium cód. D1168, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em PBS-T, durante uma hora e meia, ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Os seguintes fluoróforos foram centrifugados antes da utilização: FLG – 1:800 (Alexa 488 produzido em burro e anti-coelho (A21202, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), CDL1 – 1:200 (Alexa 488 produzido em cabra e anti-coelho A11008, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), DAPI - 1:100. As

lâminas foram lavadas novamente com PBS–T durante 5 minutos e montadas com glicerina. Para a vedação, utilizou-se esmalte. As lâminas foram protegidas da luz e acondicionadas na geladeira.

As lâminas foram digitalizadas no Pannoramic Scan (3D Histech, Hungary) em ambiente escuro (Figura 5). As imagens obtidas foram convertidas em arquivo JPEG com auxílio do programa Case Viewer (3D Histech, Hungary), sendo selecionados de 2 a 4 campos aleatórios de acordo com a quantidade de células existente em cada lâmina e com aumento de 10 vezes, disponibilizado pelo programa. A partir da obtenção desses campos, realizou-se a contagem de células utilizando-se o programa Image ProPlus32 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, EUA).

Foram quantificadas todas as células obtidas na amostragem e também as células que demonstraram imunopositividade intensa para os anticorpos estudados, obtendo-se a porcentagem da população de células imunopositivas em relação ao total de células quantificadas.

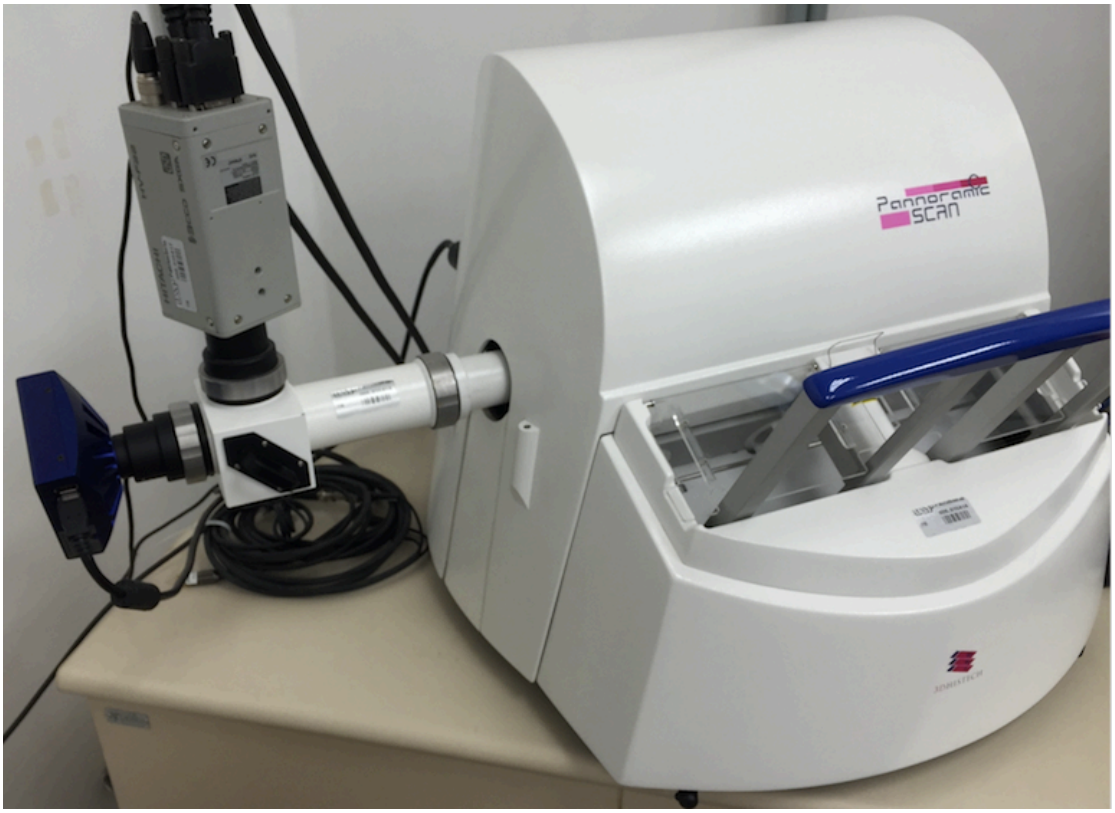


Figura 5 - Pannoramic Scan (3D Histech, Hungary)

3.7. Análise gênica

3.7.1. Extração de RNA total das células coletadas pela citologia de impressão

Para a extração do RNA total das amostras de citologia de impressão, foi utilizado Microkit RNeasy (Qiagen, Courtabouef, France) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total das amostras do grupo controle e do grupo de pacientes foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro Nanodrop 3000c (Thermo Scientific, Ashcille, NC, E.U.A.). Consideramos que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 ng de RNA. A relação de absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm de RNA total foi calculada para a certificação da ausência de contaminação protéica (260/280 nm; relação isenta de proteína = 1,8 a 2,2). Só foram utilizados os RNAs que apresentaram os valores da relação 260 e 280 nm livre de contaminação

protéica. Do total obtido para o RNA, 50 ng foram utilizados para a síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA) e o restante armazenado a -80°C.

3.7.2. Reação de transcriptase reversa

Primeiramente, os cDNAs foram sintetizados a partir de 50 ng de RNA total das amostras utilizando o kit SuperScript II (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Ao fim da reação, os cDNAs sintetizados foram então quantificados por espectrofotômetro em aparelho Nanodrop 3000c, armazenados a -20°C ou foram direcionados à próxima fase do experimento.

3.7.3. PCR em tempo real

A análise quantitativa dos genes de interesse foi realizada pela técnica de PCR em tempo real. Dois microlitros de cDNA de cada amostra foram amplificados utilizando o protocolo do kit SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) em uma reação com volume final de 25 µL e 0,2 µM de *primers* específicos para cada gene alvo FLG e CLD1. Para cada análise, foram usadas no mínimo triplicatas do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usados como gene para controle endógeno das amostras do grupo controle e do grupo de paciente uma vez que sua expressão não se modificou entre os grupos. O controle negativo da reação consistiu de água Mili-Q autoclavada em substituição ao cDNA. A amplificação dos produtos de PCR foi realizada no sistema de detecção Corbett Rotor-Gene Q (Qiagen), realizando, por 5 minutos a abertura das fitas a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 30 segundos para extensão da fita sintetizada.

Para a quantificação do transcrito utilizou-se o método de quantificação relativa ($\Delta\Delta$Ct), com a razão mRNA / mRNA alvo normalizada em relação a uma amostra do

calibrador usando o *software* de análise de fusão de alta resolução (Rotor-Gene Screen-Clust; Qiagen).

Os *primers* utilizados para a FLG foram: senso: 5′-GCAAGGTCAAGTCCAG-GAGAA-3′; antisenso: 5′-CCCTCGGTTTCCACTGTCTC-3′ [83] e para a CLD1: senso: 5′-AGCTGTTGGGCTTCATTCTCGC-3′ e antisenso: 5′–TGGGCGGTCACGATG-TTGTC-3′.[84]

3.7.4. Curva Padrão dos genes alvo

Foram desenhadas curvas padrão para os genes FLG, CLD1 e GAPDH a partir do *pool* de cDNA de todas as amostras controles. As curvas foram realizadas em duplicatas e continham as seguintes concentrações (150 ng/µL, 50 ng/µL, 35 ng/µL, 15 ng/µL e 5 ng/µL). As curvas que obtiveram valor de *r2* superior a 0,980 foram usadas para as reações futuras (Figura 6).

Baseada na curva padrão de cada gene, foi escolhido uma concentração única para fazer a réplica de cada amostra (controles e pacientes). Com isso, as réplicas foram feitas em concentração de 300 ng de cDNA para os genes testados. Para a normatização dos resultados, foi necessário realizar a replicata do gene GAPDH, tidos como controle endógeno. O programa de amplificação para as replicatas foi o mesmo utilizado anteriormente para a padronização das curvas de concentração.

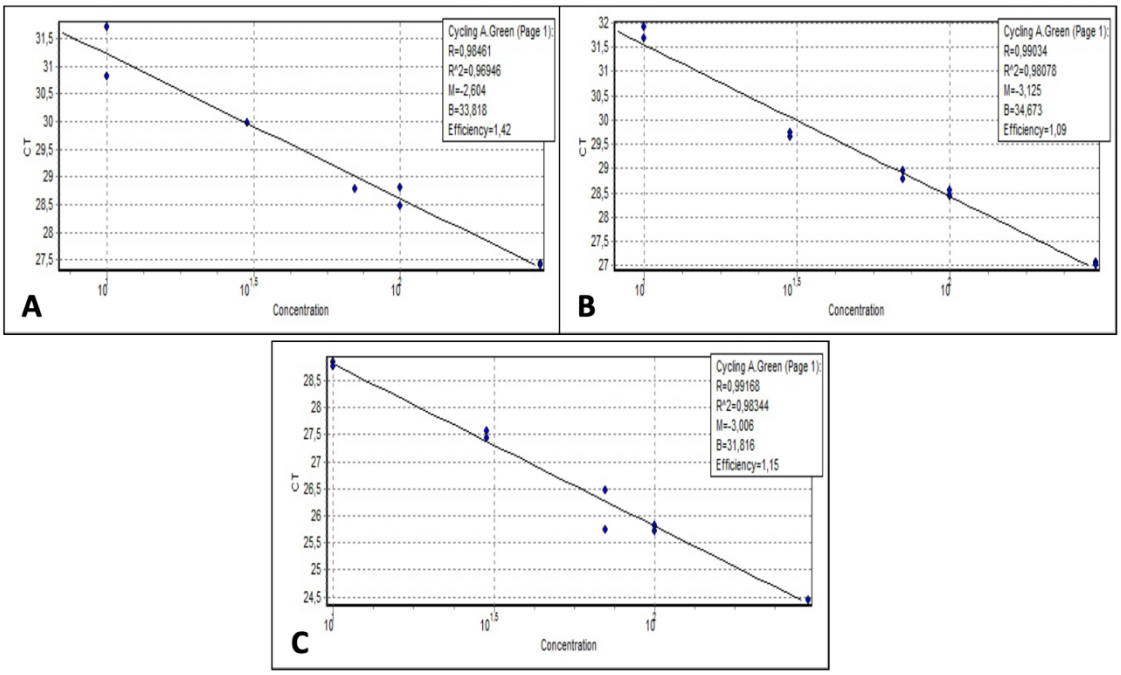


Figura 6 - Curvas-padrão de RT-PCR para os genes de interesse e endógeno a partir do pool das amostras de cDNA A. FLG; **B.** CLD1; **C.** GAPDH

3.8. Análise estatística

Para avaliação das contagens das células foram calculadas as médias das células dos setores de cada participante avaliado, bem como a razão entre as células positivas e o total de células. Foram calculadas as medidas resumo (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo) de todas as contagens avaliadas e das razões das células positivas pelo total de células segundo grupos e comparados os grupos com uso do teste de Mann-Whitney.

Para correlacionar os dados obtidos na IF e no RT-PCR com os achados clínicos entre os grupos, foram descritas as características qualitativas ou ordinais segundo grupos e verificada a existência de associação com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos

de Fisher ou comparadas as características ordinais entre os grupos com uso do teste de-Mann-Whitney.

As características quantitativas avaliadas foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas com uso do teste de Mann-Whitney, apenas as idades foram comparadas entre os grupos com uso do teste t-Student.

Os percentuais de FLG e CLD1 foram descritos segundo cada característica qualitativa nos pacientes com DA e comparadas entre as categorias com uso de testes Mann-Whitney para avaliar se existe influência dessas características nos valores das células e foram calculadas as correlações de Spearman dos percentuais das células com as características quantitativas ou ordinais avaliadas para verificar a presença de correlação entre elas.

O olho foi considerado como unidade amostral para as avaliações bilaterais e para os cálculos envolvendo FLG e CLD1 foi considerado o valor do olho mais acometido.

Para a formação dos gráficos os dados coletados foram gerenciados com o GraphPad Prism v.8.2.0 para MacOS (San Diego, CA, EUA).

O *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 22.0 foi utilizado para realização das demais análises e para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2010. Os testes foram realizados com nível de significância de 5% e IC 95%.

4. Resultados

4.1. Dados demográficos

Nesse estudo, foram incluídos 42 pacientes distribuídos em dois grupos: pacientes com DA (n=19) e controles (CT) (n=23). A média de idade dos pacientes com DA foi 38,2 anos (DP = 11,9 anos) e no grupo controle foi 45,7 anos (DP = 12,4 anos) e não houve diferença estatística entre os grupos (p = 0,054). Foram avaliados 11 homens e 8 mulheres no grupo com DA e 6 homens e 17 mulheres no grupo controle e houve associação estatisticamente significativa entre o sexo e os grupos (p = 0,037). No grupo com DA, 13 pacientes eram da raça branca e 6, da raça negra e no grupo controle, 18 pacientes eram da raça branca e 5, da raça negra (Tabela 1). A gravidade da DA foi classificada em leve (n=8) e moderada/grave (n=11). Nos pacientes com DA, a média de pontuação do EASI foi de 27,5 ± 12,1/25,9 (8,6; 55,2) e a média de IgE foi de 18237,9 UI/mL ± 19453,3 / 11757 (100; 59500), média ± DP / mediana (mín; máx).

Tabela 1 - Dados demográficos segundo grupos e resultados dos testes estatísticos

Variável	**Grupo**		**p**
	DA (N = 19)	CT (N = 23)	
Idade (anos)			0,054**
média ± DP	38,2 ± 11,9	45,7 ± 12,4	
mediana (mín.; máx.)	36 (24; 67)	43 (28; 67)	
Sexo, n (%)			**0,037**
Feminino	8 (42,1)	17 (73,9)	
Masculino	11 (57,9)	6 (26,1)	
Raça, n (%)			0,504*
Branca	13 (68,4)	18 (78,3)	
Negra	6 (31,6)	5 (21,7)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; ** Teste t-Student

4.2. Sintomas

Os sintomas e sua gravidade foram relatados pelos pacientes de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos sintomas avaliados segundo grupos e resultado dos testes estatísticos

Variável	Grupos		p
	DA (N = 19)	CT (N = 23)	
Prurido nos olhos, n (%)			**<0,001**
Sem sintomas	3 (15,8)	20 (87)	
Muito leve	3 (15,8)	2 (8,7)	
Leve	3 (15,8)	1 (4,3)	
Moderado	5 (26,3)	0 (0)	
Intenso	3 (15,8)	0 (0)	
Muito intenso	2 (10,5)	0 (0)	
Prurido nas pálpebras, n (%)			**<0,001**
Sem sintomas	3 (15,8)	23 (100)	
Muito leve	1 (5,3)	0 (0)	
Leve	3 (15,8)	0 (0)	
Moderado	4 (21,1)	0 (0)	
Intenso	5 (26,3)	0 (0)	
Muito intenso	3 (15,8)	0 (0)	
Fotofobia, n (%)			**<0,001**
Sem sintomas	6 (31,6)	21 (91,3)	
Muito leve	5 (26,3)	1 (4,3)	
Leve	5 (26,3)	1 (4,3)	
Muito intenso	3 (15,8)	0 (0)	
Lacrimejamento, n (%)			**<0,001**
Sem sintomas	7 (36,8)	23 (100)	
Muito leve	3 (15,8)	0 (0)	
Leve	1 (5,3)	0 (0)	
Moderado	1 (5,3)	0 (0)	
Intenso	4 (21,1)	0 (0)	
Muito intenso	3 (15,8)	0 (0)	

Teste Mann-Whitney

4.3. Avaliação oftalmológica

A acuidade visual média (LogMar) foi de 0,65 ± 0,91/ 0 (0;3) no grupo com DA e 0 no grupo controle. Não foram observadas alterações oculares no grupo controle, mas no grupo com DA foram encontradas variáveis relacionadas às manifestações oculares da doença. Eczema palpebral e fibrose conjuntival foram as características oculares mais frequentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Características oculares avaliadas segundo grupos e resultados dos testes estatísticos

Variável	Grupos		p
	DA (N = 19)	CT (N = 23)	
Eczema palpebral			**<0,001**
Ausente	4 (21,1)	23 (100)	
Presente	15 (78,9)	0 (0)	
Perda lateral dos supercílios			0,199*
Ausente	17 (89,5)	23 (100)	
Presente	2 (10,5)	0 (0)	
Dupla prega palpebral			**0,002***
Ausente	12 (63,2)	23 (100)	
Presente	7 (36,8)	0 (0)	
Ectrópio			0,084*
Ausente	16 (84,2)	23 (100)	
Presente	3 (15,8)	0 (0)	
Ptose Palpebral			**0,014***
Ausente	14 (73,7)	23 (100)	
Presente	5 (26,3)	0 (0)	
Fissuras em pele das pálpebras			**0,002***
Ausente	12 (63,2)	23 (100)	
Presente	7 (36,8)	0 (0)	
Escurecimento da pele periorbital			0,084*
Ausente	16 (84,2)	23 (100)	
Presente	3 (15,8)	0 (0)	
Hiperemia conjuntival			0,452*
Ausente	18 (94,7)	23 (100)	
Presente	1 (5,3)	0 (0)	
Fibrose Conjuntival			**<0,001**
Ausente	5 (26,3)	23 (100)	
Presente	14 (73,7)	0 (0)	
Hipertrofia de papilas			**0,005***
Ausente	13 (68,4)	23 (100)	
Presente	6 (31,6)	0 (0)	
Neovascularização na córnea			**0,035***
Ausente	15 (78,9)	23 (100)	
Presente	4 (21,1)	0 (0)	
Opacidades na córnea			**0,005***
Ausente	13 (68,4)	23 (100)	
Presente	6 (31,6)	0 (0)	
Catarata subcapsular			**0,035***
Ausente	15 (78,9)	23 (100)	
Presente	4 (21,1)	0 (0)	
Ceratoplastia			0,084*
Ausente	16 (84,2)	23 (100)	
Presente	3 (15,8)	0 (0)	
Ceratocone			**<0,001***
Ausente	10 (52,6)	23 (100)	
Presente	9 (47,4)	0 (0)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher

4.4. Avaliação da superfície ocular

Nos testes clínicos realizados para avaliação da superfície ocular, valores significativamente menores do TRFL foram observados em pacientes com DA (p = 0,007). A coloração com rosa Bengala estava presente apenas no grupo com DA (p<0,001); a coloração com fluoresceína foi estatisticamente mais intensa no grupo com DA (p < 0,001). As pontuações do OSDI foram significativamente maiores no grupo com DA 27,1 ± 16,9 / 27,1 (2,3; 64,6) do que no grupo CT 4,2 ± 7,9 / 2,1 (0; 33,3), média ± DP / mediana (mín; máx) (p <0,001). Os resultados do teste de Schirmer I estavam dentro da normalidade em ambos os grupos, porém os pacientes com DA apresentaram valores menores em relação ao grupo controle (p = 0,61) (Tabela 4).

Tabela 4 - Testes clínicos para avaliação da superfície ocular segundo grupos e resultados dos testes estatísticos

Variável	Grupo		p
	DA (N = 19)	Controle (N = 23)	
OSDI			**<0,001**
média ± DP	27,1 ± 16,9	4,2 ± 7,9	
mediana (mín.; máx.)	27,1 (2,3; 64,6)	2,1 (0; 33,3)	
Rosa Bengala			**<0,001**
média ± DP	0,89 ± 0,99	0 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 3)	0 (0; 0)	
Fluoresceína			**<0,001**
média ± DP	1,21 ± 1,03	0,13 ± 0,34	
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 3)	0 (0; 1)	
TRFL			**0,007**
média ± DP	6,9 ± 2,35	8,85 ± 1,04	
mediana (mín.; máx.)	7 (3; 10)	9 (7; 10)	
Teste de Schirmer I			0,061
média ± DP	16,8 ± 11,2	23 ± 7,7	
mediana (mín.; máx.)	16 (3; 35)	24 (10; 35)	

Teste Mann-Whitney
DA: dermatite atópica; CT: controles; DP: desvio padrão; OSDI*: ocular surface disease index*; TRFL: tempo de ruptura do filme lacrimal.

4.5. Avaliação da expressão das proteínas FLG e CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA e controles pela análise de IF

A expressão das proteínas FLG e CLD1 foi estatisticamente maior nos pacientes com DA que nos controles ($p = 0,044$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 7).

Os valores para FLG foram 3,1 ± 3,6 / 2,4 (0; 14,1) para o grupo controle e 8,3 ± 9,8/ 4,7 (0,3; 29,2) para os pacientes com DA; para a CLD1, os valores foram 3,2 ± 3,6 /1,7 (0 ; 13,5) para o grupo controle e 7,2 ± 4,5 / 5,7 (0,7; 16) para os pacientes com DA, média ± DP / mediana (mín; máx).

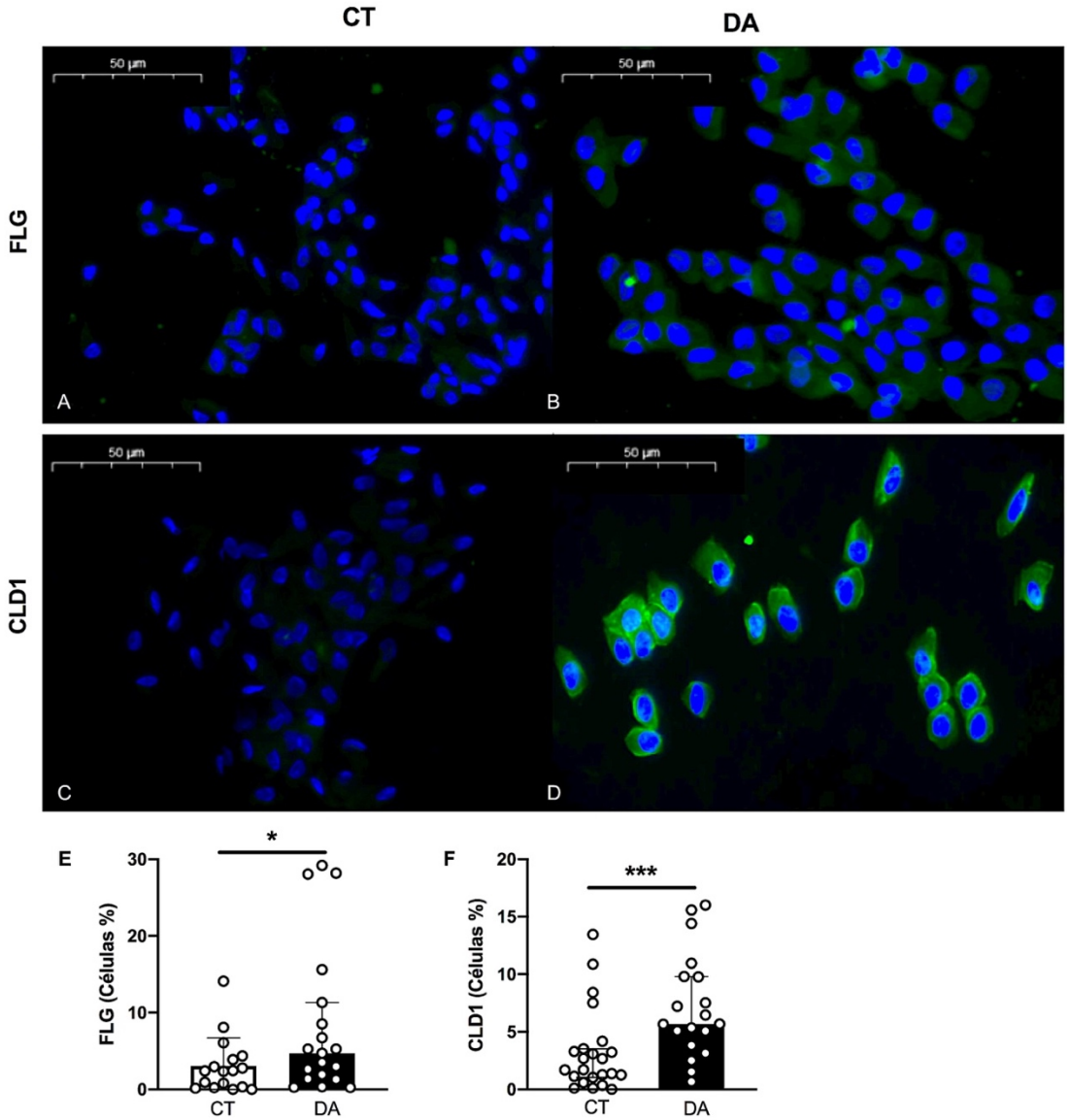


Figura 7 - Expressão aumentada da FLG e CLD1 na superfície ocular. Lâminas de IF com dupla marcação evidenciando a expressão da FLG (A e B) e CLD1 (C e D) em células da superfície ocular de pacientes com DA (n = 19) e CTs para FLG (n = 17) e CLD1 (n = 23). A coloração azul representa o núcleo das células (DAPI) e a verde, a expressão da FLG ou CLD1. As linhas representam medianas com faixas interquartis de expressão da FLG (E) e CLD1 (F) em células oculares avaliadas pela IF Teste de Mann-Whitney* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.6. Avaliação da expressão dos transcritos de RNAm das proteínas FLG e CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA e controles pela análise de RT-PCR

A expressão dos transcritos de RNAm para a FLG e para a CLD1 foi estatisticamente maior nos pacientes com DA que nos controles ($p = 0,040$ e $p < 0,018$, respectivamente) (Figura 8).

Os valores para FLG foram 0,92 ± 0,84/ 0,54 (0,15; 2,6) para o grupo controle e 1,57 ± 1,55/ 0,81 (0,37; 6,43) para os pacientes com DA; para a CLD1, os valores foram 1,13 ± 0,67 /1,05 (0,48; 3,77) para o grupo controle e 2,3 ± 1,66/1,49 (0,47;5,5) para os pacientes com DA, média ± DP / mediana (mím; máx).

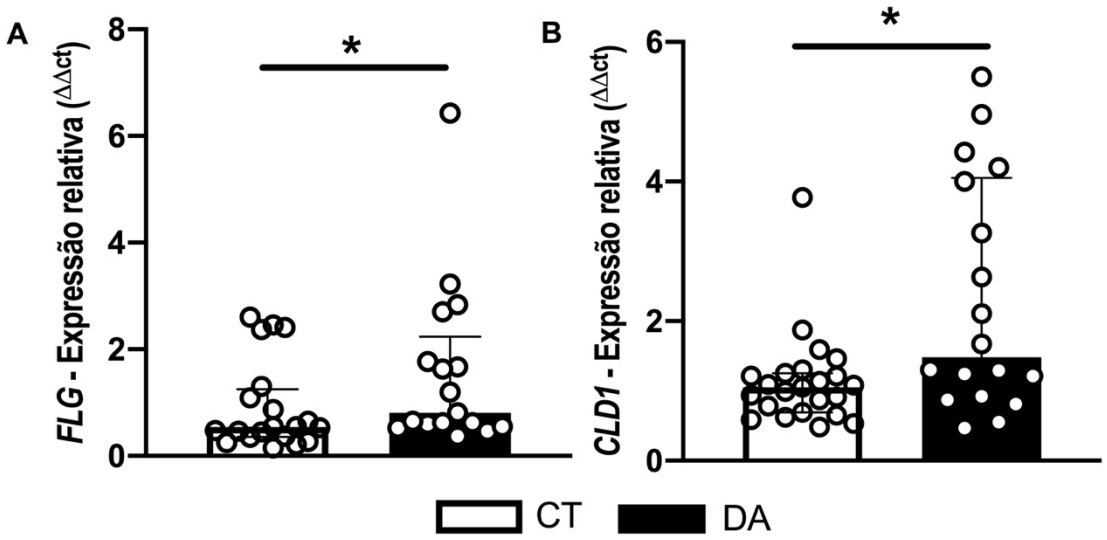


Figura 8 - Expressão do gene FLG e CLD1 avaliada por RT-PCR. A. Aumento da expressão de transcritos de RNAm FLG (n = 17) e B. CLD1 (n = 18) em células conjuntivais de pacientes com DA em comparação com controles saudáveis CT (FLG, n = 20) / CLD1, n = 23). As linhas representam medianas com intervalos interquartis de expressão de transcritos de RNAm da FLG e CLD1
Teste de Mann-Whitney * p <0,05

4.7. Correlação entre as proteínas FLG e CLD1 e seus transcritos de RNAm e o quadro clínico ocular (caraterísticas oculares e testes clínicos para avaliação da superfície ocular), sintomas e gravidade da DA

Não houve correlação entre o percentual das proteínas FLG e CLD1 e as características oculares (Tabelas 5 e 6). Houve correlação direta e estatisticamente significativa entre os transcritos de RNAm da FLG e a presença de eczema palpebral e fibrose conjuntival nos pacientes com DA (Tabela 7). Houve correlação entre os transcritos de RNAm da CLD1 e a ptose palpebral (Tabela 8).

Tabela 5 - Descrição da expressão da proteína FLG pela análise de IF nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares

Variável	Categoria		p
	Ausente	Presente	
Eczema	**(N = 4)**	**(N = 15)**	0,469
média ± DP	12,41 ± 12,83	7,2 ± 9,07	
mediana (mín.; máx.)	9,56 (1,32; 29,18)	4,72 (0,26; 28,18)	
Perda lateral dos supercílios	**(N = 17)**	**(N = 2)**	0,947
média ± DP	8,7 ± 10,3	4,86 ± 2,65	
mediana (mín.; máx.)	4,72 (0,26; 29,18)	4,86 (2,99; 6,74)	
Dupla prega palpebral	**(N = 12)**	**(N = 7)**	0,384
média ± DP	9,25 ± 10,03	6,66 ± 9,95	
mediana (mín.; máx.)	4,99 (0,26; 29,18)	2,64 (0,29; 28,18)	
Ectrópio	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,793
média ± DP	9,12 ± 10,48	3,88 ± 2,69	
mediana (mín.; máx.)	4,99 (0,26; 29,18)	3,51 (1,39; 6,74)	
Ptose palpebral	**(N = 14)**	**(N = 5)**	0,754
média ± DP	8,15 ± 9,75	8,7 ± 11,12	
mediana (mín.; máx.)	4,12 (0,26; 29,18)	5,26 (1,39; 28,18)	
Fissuras na pele das pálpebras	**(N = 12)**	**(N = 7)**	0,773
média ± DP	8,9 ± 10,2	7,25 ± 9,78	
mediana (mín.; máx.)	4,12 (0,26; 29,18)	5,26 (0,29; 28,18)	
Escurecimento da pele periorbital	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,359
média ± DP	7,48 ± 9,29	12,64 ± 13,59	
mediana (mín.; máx.)	4,12 (0,26; 29,18)	6,74 (2,99; 28,18)	
Hiperemia conjuntival	**(N = 18)**	**(N = 1)**	0,842
média ± DP	8,46 ± 10,06	5,26 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	4,12 (0,26; 29,18)	5,26 (5,26; 5,26)	
Fibrose conjuntival	**(N = 5)**	**(N = 14)**	0,219
média ± DP	12,43 ± 10,89	6,82 ± 9,36	
mediana (mín.; máx.)	11,31 (1,32; 29,18)	3,25 (0,26; 28,18)	
Hipertrofia de papilas	**(N = 13)**	**(N = 6)**	0,282
média ± DP	6,42 ± 7,9	12,36 ± 12,94	
mediana (mín.; máx.)	3,51 (0,26; 28,07)	6,9 (0,36; 29,18)	
Neovascularizaçao na córnea	**(N = 15)**	**(N = 4)**	>0,999
média ± DP	7,94 ± 9,34	9,62 ± 12,9	
mediana (mín.; máx.)	4,72 (0,26; 29,18)	4,97 (0,36; 28,18)	
Opacidades na córnea	**(N = 13)**	**(N = 6)**	0,282
média ± DP	10,55 ± 11,09	3,41 ± 3,02	
mediana (mín.; máx.)	5,26 (0,26; 29,18)	2,46 (0,36; 8,54)	
Catarata subcapsular	**(N = 15)**	**(N = 4)**	0,100
média ± DP	9,92 ± 10,4	2,19 ± 3,07	
mediana (mín.; máx.)	5,26 (0,26; 29,18)	0,88 (0,29; 6,74)	
Ceratoplastia	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,421
média ± DP	9,21 ± 10,35	3,43 ± 4,45	
mediana (mín.; máx.)	4,99 (0,26; 29,18)	1,39 (0,36; 8,54)	
Ceratocone	**(N = 10)**	**(N = 9)**	0,113
média ± DP	12,66 ± 11,84	3,44 ± 2,88	
mediana (mín.; máx.)	8,29 (0,29; 29,18)	2,99 (0,26; 8,54)	

Teste Mann-Whitney

Tabela 6 - Descrição da expressão da proteína CLD1 pela análise de IF nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares

Variável	Categoria		p
	Ausente	Presente	
Eczema	**(N = 4)**	**(N = 15)**	0,596
média ± DP	6,93 ± 5,07	7,23 ± 4,57	
mediana (mín.; máx.)	5,08 (3,15; 14,41)	6,47 (0,68; 16)	
Perda lateral dos supercílios	**(N = 17)**	**(N = 2)**	0,421
média ± DP	7,53 ± 4,63	4,09 ± 2,24	
mediana (mín.; máx.)	6,47 (0,68; 16)	4,09 (2,5; 5,67)	
Dupla prega palpebral	**(N = 12)**	**(N = 7)**	0,837
média ± DP	7,02 ± 4,42	7,43 ± 5,06	
mediana (mín.; máx.)	5,66 (1,53; 16)	6,47 (0,68; 15,57)	
Ectrópio	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,254
média ± DP	7,75 ± 4,66	4,1 ± 2,24	
mediana (mín.; máx.)	6,83 (0,68; 16)	5,09 (1,53; 5,67)	
Ptose palpebral	**(N = 14)**	**(N = 5)**	0,687
média ± DP	7,71 ± 4,91	5,67 ± 3,2	
mediana (mín.; máx.)	6,06 (0,68; 16)	5,67 (1,53; 9,8)	
Fissuras na pele das pálpebras	**(N = 12)**	**(N = 7)**	0,837
média ± DP	7,35 ± 4,15	6,86 ± 5,46	
mediana (mín.; máx.)	6,06 (2,5; 16)	5,67 (0,68; 15,57)	
Escurecimento da pele periorbital	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,875
média ± DP	7,39 ± 4,75	5,99 ± 3,66	
mediana (mín.; máx.)	6,06 (0,68; 16)	5,67 (2,5; 9,8)	
Hiperemia conjuntival	**(N = 18)**	**(N = 1)**	0,842
média ± DP	7,27 ± 4,64	5,35 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	6,07 (0,68; 16)	5,35 (5,35; 5,35)	
Fibrose conjuntival	**(N = 5)**	**(N = 14)**	>0,999
média ± DP	7,62 ± 4,5	7,01 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	5,65 (3,15; 14,41)	6,07 (0,68; 16)	
Hipertrofia de papilas	**(N = 13)**	**(N = 6)**	0,966
média ± DP	7,18 ± 4,49	7,16 ± 5,06	
mediana (mín.; máx.)	5,67 (1,53; 16)	5,91 (0,68; 15,57)	
Neovascularizaçao na córnea	**(N = 15)**	**(N = 4)**	0,736
média ± DP	7,24 ± 3,95	6,9 ± 7,1	
mediana (mín.; máx.)	5,67 (2,5; 16)	5,67 (0,68; 15,57)	
Opacidades na córnea	**(N = 13)**	**(N = 6)**	0,127
média ± DP	8,05 ± 3,89	5,27 ± 5,59	
mediana (mín.; máx.)	6,47 (3,15; 16)	3,16 (0,68; 15,57)	
Catarata subcapsular	**(N = 15)**	**(N = 4)**	0,307
média ± DP	7,83 ± 4,41	4,71 ± 4,71	
mediana (mín.; máx.)	6,47 (2,5; 16)	3,6 (0,68; 10,97)	
Ceratoplastia	**(N = 16)**	**(N = 3)**	0,359
média ± DP	7,4 ± 3,87	5,93 ± 8,36	
mediana (mín.; máx.)	6,07 (2,5; 16)	1,53 (0,68; 15,57)	
Ceratocone	**(N = 10)**	**(N = 9)**	0,133
média ± DP	8,67 ± 4,25	5,51 ± 4,46	
mediana (mín.; máx.)	8,12 (3,15; 16)	5,09 (0,68; 15,57)	

Teste Mann-Whitney

Tabela 7 - Descrição dos transcritos de RNAm da FLG nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares

Variável	Categoria		p
	Ausente	Presente	
Eczema	**(N = 4)**	**(N = 13)**	**0,003**
média ± DP	0,49 ± 0,11	1,9 ± 1,64	
mediana (mín.; máx.)	0,49 (0,37; 0,62)	1,63 (0,55; 6,43)	
Perda lateral dos supercílios	**(N = 15)**	**(N = 2)**	0,368
média ± DP	1,31 ± 0,96	3,54 ± 4,09	
mediana (mín.; máx.)	0,81 (0,37; 3,22)	3,54 (0,65; 6,43)	
Dupla prega palpebral	**(N = 10)**	**(N = 7)**	0,962
média ± DP	1,75 ± 1,88	1,3 ± 0,99	
mediana (mín.; máx.)	0,93 (0,37; 6,43)	0,81 (0,52; 3,22)	
Ectrópio	**(N = 14)**	**(N = 3)**	0,953
média ± DP	1,69 ± 1,67	0,98 ± 0,6	
mediana (mín.; máx.)	1,01 (0,37; 6,43)	0,65 (0,62; 1,67)	
Ptose palpebral	**(N = 13)**	**(N = 4)**	0,624
média ± DP	1,78 ± 1,71	0,89 ± 0,52	
mediana (mín.; máx.)	1,2 (0,37; 6,43)	0,64 (0,6; 1,67)	
Fissuras na pele das pálpebras	**(N = 11)**	**(N = 6)**	0,884
média ± DP	1,87 ± 1,84	1,01 ± 0,56	
mediana (mín.; máx.)	1,2 (0,37; 6,43)	0,73 (0,55; 1,77)	
Escurecimento da pele periorbital	**(N = 14)**	**(N = 3)**	0,591
média ± DP	1,35 ± 0,98	2,57 ± 3,35	
mediana (mín.; máx.)	1,01 (0,37; 3,22)	0,65 (0,62; 6,43)	
Hiperemia conjuntival	**(N = 16)**	**(N = 1)**	0,235
média ± DP	1,47 ± 1,54	3,22 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	0,73 (0,37; 6,43)	3,22 (3,22; 3,22)	
Fibrose conjuntival	**(N = 4)**	**(N = 13)**	**0,023**
média ± DP	0,64 ± 0,38	1,85 ± 1,67	
mediana (mín.; máx.)	0,49 (0,37; 1,2)	1,63 (0,55; 6,43)	
Hipertrofia de papilas	**(N = 11)**	**(N = 6)**	0,808
média ± DP	1,68 ± 1,79	1,36 ± 1,08	
mediana (mín.; máx.)	0,81 (0,46; 6,43)	1,13 (0,37; 3,22)	
Neovascularizaçao na córnea	**(N = 13)**	**(N = 4)**	0,956
média ± DP	1,7 ± 1,74	1,15 ± 0,66	
mediana (mín.; máx.)	0,81 (0,37; 6,43)	1,15 (0,55; 1,77)	
Opacidades na córnea	**(N = 12)**	**(N = 5)**	0,574
média ± DP	1,3 ± 1,04	2,2 ± 2,43	
mediana (mín.; máx.)	0,73 (0,37; 3,22)	1,67 (0,55; 6,43)	
Catarata subcapsular	**(N = 13)**	**(N = 4)**	0,785
média ± DP	1,77 ± 1,72	0,92 ± 0,51	
mediana (mín.; máx.)	1,2 (0,37; 6,43)	0,73 (0,55; 1,67)	
Ceratoplastia	**(N = 14)**	**(N = 3)**	0,859
média ± DP	1,62 ± 1,69	1,33 ± 0,68	
mediana (mín.; máx.)	0,73 (0,37; 6,43)	1,67 (0,55; 1,77)	
Ceratocone	**(N = 9)**	**(N = 8)**	0,481
média ± DP	1,3 ± 1,06	1,87 ± 2	
mediana (mín.; máx.)	0,81 (0,37; 3,22)	1,16 (0,55; 6,43)	

Teste Mann-Whitney

Tabela 8 - Descrição dos transcritos de RNAm da CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva nos pacientes com DA segundo características oculares

Variável	Categoria		p
	Ausente	Presente	
Eczema	**(N = 4)**	**(N = 14)**	0,327
média ± DP	1,56 ± 1,15	2,51 ± 1,75	
mediana (mín.; máx.)	1,08 (0,81; 3,26)	1,89 (0,47; 5,5)	
Perda lateral dos supercílios	**(N = 16)**	**(N = 2)**	0,471
média ± DP	2,22 ± 1,68	2,94 ± 1,79	
mediana (mín.; máx.)	1,3 (0,47; 5,5)	2,94 (1,67; 4,2)	
Dupla prega palpebral	**(N = 11)**	**(N = 7)**	0,860
média ± DP	2,28 ± 1,41	2,33 ± 2,11	
mediana (mín.; máx.)	1,67 (0,81; 4,42)	1,3 (0,47; 5,5)	
Ectrópio	**(N = 15)**	**(N = 3)**	0,360
média ± DP	2,17 ± 1,74	2,98 ± 1,19	
mediana (mín.; máx.)	1,29 (0,47; 5,5)	3,26 (1,67; 4)	
Ptose palpebral	**(N = 13)**	**(N = 5)**	**0,046**
média ± DP	1,87 ± 1,56	3,43 ± 1,46	
mediana (mín.; máx.)	1,24 (0,47; 5,5)	4 (1,67; 4,96)	
Fissuras na pele das pálpebras	**(N = 11)**	**(N = 7)**	0,536
média ± DP	2,21 ± 1,78	2,45 ± 1,57	
mediana (mín.; máx.)	1,24 (0,55; 5,5)	2,11 (0,47; 4,96)	
Escurecimento da pele periorbital	**(N = 15)**	**(N = 3)**	0,130
média ± DP	2,04 ± 1,57	3,61 ± 1,72	
mediana (mín.; máx.)	1,29 (0,47; 5,5)	4,2 (1,67; 4,96)	
Hiperemia conjuntival	**(N = 17)**	**(N = 1)**	0,222
média ± DP	2,4 ± 1,65	0,55 ± 0	
mediana (mín.; máx.)	1,67 (0,47; 5,5)	0,55 (0,55; 0,55)	
Fibrose conjuntival	**(N = 4)**	**(N = 14)**	0,127
média ± DP	1,07 ± 0,24	2,65 ± 1,72	
mediana (mín.; máx.)	1,08 (0,81; 1,29)	2,37 (0,47; 5,5)	
Hipertrofia de papilas	**(N = 12)**	**(N = 6)**	0,553
média ± DP	2,32 ± 1,34	2,27 ± 2,32	
mediana (mín.; máx.)	1,89 (0,87; 4,42)	1,06 (0,47; 5,5)	
Neovascularizaçao na córnea	**(N = 14)**	**(N = 4)**	0,798
média ± DP	2,19 ± 1,57	2,68 ± 2,14	
mediana (mín.; máx.)	1,48 (0,55; 5,5)	2,65 (0,47; 4,96)	
Opacidades na córnea	**(N = 12)**	**(N = 6)**	0,437
média ± DP	2,08 ± 1,67	2,75 ± 1,68	
mediana (mín.; máx.)	1,27 (0,55; 5,5)	3,06 (0,47; 4,42)	
Catarata subcapsular	**(N = 14)**	**(N = 4)**	0,959
média ± DP	2,33 ± 1,75	2,19 ± 1,49	
mediana (mín.; máx.)	1,3 (0,55; 5,5)	2,15 (0,47; 4)	
Ceratoplastia	**(N = 15)**	**(N = 3)**	0,654
média ± DP	2,38 ± 1,68	1,92 ± 1,85	
mediana (mín.; máx.)	1,67 (0,55; 5,5)	1,3 (0,47; 4)	
Ceratocone	**(N = 9)**	**(N = 9)**	0,436
média ± DP	2,09 ± 1,88	2,52 ± 1,48	
mediana (mín.; máx.)	1,24 (0,55; 5,5)	2,11 (0,47; 4,42)	

Teste Mann-Whitney

Já em relação às medidas de avaliação da superfície ocular, o TRFL apresentou correlação direta estatisticamente significativa com o percentual de FLG ($r = 0,635$ e $p = 0,003$), ou seja, quanto maior o valor do TRFL, maior o percentual de FLG nos pacientes com DA. Os resultados com a fluoresceína demostraram correlação inversa estatisticamente significativa entre a coloração e o percentual da FLG ($r = -0,487$ e $p = 0,034$) nos pacientes com DA.

Não houve correlação entre o percentual das proteínas FLG e CLD1, assim como dos seus transcritos de RNAm e a gravidade da DA (níveis de IgE e EASI), coloração rosa-Bengala, teste de Schirmer I e sintomas oculares, incluindo os resultados do questionário OSDI (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação entre a gravidade da DA (EASI e níveis de IgE), testes clínicos de avaliação da superfície ocular (OSDI, corantes fluoresceína e rosa Bengala; TRFL e teste de Schirmer I) e sintomas oculares e a expressão das proteínas FLG e CLD1, e seus transcritos de RNAm

Correlação		IF FLG	FLG-expressão relativa ΔΔCt	IF CLD1	CLD1- expressão relativa ΔΔCt
EASI	r	-0,142	-0,213	0,318	-0,100
	p	0,562	0,411	0,185	0,693
	N	19	17	19	18
IgE	r	-0,346	0,113	0,273	0,182
	p	0,147	0,666	0,258	0,470
	N	19	17	19	18
OSDI	r	-0,108	0,385	-0,142	0,057
	p	0,660	0,127	0,562	0,823
	N	19	17	19	18
Rosa Bengala	r	-0,324	0,210	0,006	-0,133
	p	0,177	0,418	0,982	0,599
	N	19	17	19	18
Fluoresceína	r	-0,487	0,242	-0,213	0,257
	p	**0,034**	0,349	0,381	0,303
	N	19	17	19	18
TRFL	r	0,635	-0,324	0,131	-0,104
	p	**0,003**	0,204	0,594	0,682
	N	19	17	19	18
Teste de Schirmer I	r	0,307	-0,127	-0,096	0,165
	p	0,201	0,626	0,695	0,512
	N	19	17	19	18
Prurido nos olhos	r	0,188	0,112	-0,367	0,169
	p	0,440	0,669	0,122	0,502
	N	19	17	19	18
Prurido nas pálpebras	r	-0,217	0,235	-0,189	0,017
	p	0,372	0,364	0,437	0,947
	N	19	17	19	18
Fotofobia	r	0,074	0,248	-0,230	0,049
	p	0,763	0,337	0,343	0,846
	N	19	17	19	18
Lacrimejamento	r	0,156	0,164	-0,210	0,162
	p	0,523	0,530	0,389	0,520
	N	19	17	19	18

Correlação de Spearman

5. Discussão

Na pele, a FLG localiza-se na epiderme, no citoplasma dos queratinócitos e tem a função de agregar os filamentos de queratina para formação e organização do estrato córneo.[57, 85] A FLG também desempenha papel crucial da hidratação dessa camada, impedindo a perda dos fluidos vitais.[58] Na superfície ocular, a FLG encontra-se na camada basal das células epiteliais da córnea,[86] mas não na conjuntiva bulbar.[74, 87, 88] Vários estudos demostraram que mutações no gene da FLG estão associadas ao desenvolvimento de atopias, incluindo a DA.[23, 59-62, 89] No entanto, até o momento, pouco foi discutido a respeito da função da FLG na superfície ocular hígida e de pacientes com DA.

Por outro lado, sabe-se que em pacientes com distúrbios de cicatrização da superfície ocular (por exemplo, penfigóide cicatricial, síndrome de Stevens–Johnson e traumas químicos) ocorre aumento da FLG na conjuntiva, associado ao sofrimento contínuo da superfície ocular, e pode colaborar para o processo de queratinização patológica da mucosa nessas doenças.[87, 88, 90]

No presente estudo, verificamos que nos indivíduos portadores da DA, há aumento da FLG nas células epiteliais da conjuntiva, tanto na análise pela IF como na expressão gênica, fenômeno inverso ao observado na pele dos portadores de DA.[10] Uma possível razão para este aumento da FLG nas células da conjuntiva seria a tentativa da superfície ocular proteger-se da agressão provocada pela inflamação ocular relacionada ao quadro da DA e ao quadro de olho seco associado nestes pacientes, como já observado em outras doenças cicatriciais crônicas da conjuntiva.[88]

A pesquisa nos bancos de dados acadêmicos (Pubmed e Medline) revelou que o nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que: 1) FLG pode ser expressa na conjuntiva

bulbar de indivíduos saudáveis, e 2) as expressões da FLG e CLD1 na conjuntiva bulbar (IF e RT-PCR) são maiores nos indivíduos com DA do que nos controles saudáveis.

Um estudo prévio detectou a expressão do RNAm da FLG na superfície ocular de indivíduos saudáveis base em culturas de células de fragmentos de conjuntiva de botões de doadores.[91] Em contraste, nós avaliamos material in vivo e analisamos não apenas a expressão do RNAm, mas também o estágio subsequente, que é expressão da proteína na mesma amostra.

No presente estudo, os pacientes com DA apresentaram níveis elevados de FLG e CLD1 nas células epiteliais da conjuntiva. Isso é o oposto do que seria esperado na pele de pacientes com DA.[12, 92] De fato, o perfil de proteínas da pele dos pacientes incluídos em nosso estudo foi publicado anteriormente e mostrou expressão reduzida de FLG e CLD1 na pele.[10] Os níveis elevados de FLG nas células epiteliais da conjuntiva podem ser uma resposta protetora da superfície ocular à inflamação relacionada à DA e à síndrome do olho seco, como demonstrado para outros distúrbios cicatriciais crônicos da conjuntiva, processo referido como queratinização patológica.[88, 90, 93] O aumento dos níveis de transcritos de RNAm da FLG nas células da conjuntiva dos pacientes com DA que apresentaram fibrose conjuntival corrobora com esse fato.

Além de desempenhar funções essenciais e específicas na barreira epitelial da epiderme, as CLDs também estão envolvidas no processo de queratinização.[68, 94] Isso pode explicar o aumento de CLD1 na superfície ocular dos pacientes com DA avaliados neste estudo. Outros autores já estudaram alterações das CLDs em doenças conjuntivais. Um estudo demonstrou diminuição da expressão de CLD1 no pterígio em comparação com a conjuntiva normal.[95] Outro estudo mostrou expressão diminuída de CLD4 em granulomas conjuntivais.[96] Porém, esses processos estão mais relacionados ao perfil fibrovascular e à degeneração do estroma conjuntival e não estão relacionados à

queratinização, que tem relação com o aumento da expressão de CLDs, como ocorreu nos nossos resultados. Não há dados na literatura avaliando o comportamento da CLD1 na conjuntiva de pacientes com DA.

Os níveis de FLG são normalmente baixos (de acordo com nossos resultados) ou ausentes na conjuntiva bulbar - um epitélio não queratinizado.[74, 87] Como a FLG desempenha um papel na hidratação e na prevenção de perda de fluido vital na pele,[58] níveis mais altos de FLG durante os estágios iniciais da inflamação da superfície ocular pode funcionar como fator protetor e ajudar a estabilizar o filme lacrimal. Como esperado, os valores de TRFL foram mais baixos no grupo com DA do que no grupo controle, uma vez que as alterações oculares da DA estão geralmente associadas à doenças do olho seco devido à produção reduzida de filme lacrimal e ao aumento da evaporação das lágrimas.[45, 97, 98] Por outro lado, o TRFL mostrou correlação significativa e positiva com níveis aumentados de FLG em pacientes com DA, reforçando a ideia de que a expressão de FLG na superfície ocular tem uma função protetora. Outro achado interessante em nosso estudo, que apóia a mesma ideia, foi a correlação negativa e significativa da FLG com a graduação de coloração da fluoresceína na superfície ocular em pacientes com DA (ou seja, quanto maior a expressão de FLG, mais fraca a coloração).

Dessa maneira, a desregulação das proteínas FLG e CLD1 encontrada na conjuntiva dos pacientes com DA parece ter relação com um processo secundário de resposta ao sofrimento da superfície ocular, com intuito de proteção, mas que resultaria na cicatrização e queratinização da conjuntiva, e podem, não necessariamente, estar relacionada com a fisiopatologia das alterações oculares da DA, como ocorre na pele. Outros estudos suportam essa teoria, sugerindo que não há relação entre mutações comuns da FLG, um dos maiores pilares envolvidos na etiopatogenese da DA, e a prevalência de AKC[86, 91] e de outras manifestações oculares[99] nos pacientes com DA.

Quanto aos achados clínicos, a acuidade visual foi pior no grupo com DA do que no grupo controle, corroborando com os resultados de estudos que mostram perda de visão em pacientes com DA devido a cicatrizes da córnea, catarata, ceratocone e outras comorbidades.[42, 49, 98, 100-103]

A produção lacrimal, avaliada pelo teste de Schirmer I, foi menor no grupo DA do que no grupo controle, mas dentro da faixa normal. Diminuição semelhante na produção lacrimal foi relatada em estudo anteriores em pacientes com DA.[61-63] Isso pode ser devido ao uso sistêmico e contínuo de anti-histamínicos, uma estratégia comum no controle das lesões cutâneas relacionadas à DA. O medicamento pode afetar os receptores muscarínicos das glândulas lacrimais, reduzindo a produção de lágrimas.[45] Em relação ao uso de medicações para o tratamento das lesões cutâneas da DA, estudos têm mostrado que o uso do Dupilumab, anticorpo monoclonal recentemente aprovado pelo FDA, está associado ao desenvolvimento de conjuntivites nesses pacientes.[104-106] A fisiopatogênese dessa complicação ocular ainda não foi esclarecida.

A graduação da coloração com fluoresceína e rosa Bengala revelou sofrimento epitelial na córnea e conjuntiva nos pacientes com DA. A perda da integridade da barreira epitelial está associada a doenças alérgicas em geral, o que também ocorre na superfície ocular.[107, 108] Outros autores relataram alterações epiteliais na conjuntivite alérgica, principalmente nos subtipos vernal e AKC,[109, 110] caracterizados pela perda da camada de glicocálice e que foram utilizados como marcadores de lesão epitelial.[111]

Os resultados do questionário OSDI mostraram que pacientes com DA apresentam queixas relacionadas a alterações na superfície ocular, conforme o esperado, mas não houve correlação com os resultados da FLG e CLD1.

Não há marcador patognomônico para o diagnóstico da DA. A desregulação imunológica (um dos pilares da fisiopatologia da DA) está associada a níveis séricos

elevados de IgE, observados na maioria dos casos, e é considerada o achado laboratorial mais típico e um indicador da gravidade da doença.[112] Os níveis elevados de IgE de nossos pacientes eram compatíveis com a literatura,[113, 114] mas não estavam correlacionados com a porcentagem das proteínas FLG e CLD1. Assim como também não houve correlação entre a classificação EASI dos pacientes com DA e o perfil das proteínas. Esses resultados sugerem que não há uma relação de interdependência entre o quadro clínico da DA e suas manifestações oculares, como já publicado previamente.[38, 115]

A DA pode causar um impacto significativo na visão do paciente, mesmo se tratada adequadamente[37], e os achados relacionados a FLG e CLD1 podem levar ao desenvolvimento e à pesquisa do tratamento. Experimentos envolvendo FLG recombinante já foram demonstrados.[116, 117] Nosso estudo fornece *insights* sobre o papel do FLG e CLD1 na fisiopatologia das manifestações oculares na DA. Investigações adicionais sobre o comportamento e a função de FLG e CLD1 na barreira ocular de pacientes com DA são necessárias para esclarecer a etiologia da doença e desenvolver terapias eficazes e direcionadas.

6. Conclusões

Nas condições de realização desse estudo, conclui-se que:

1. As células epiteliais conjuntivais de pacientes com DA apresentaram expressão aumentada da FLG e CLD1 em relação aos controles sadios, tanto na IF quanto no RT-PCR, em contraste com os achados cutâneos relacionados. Nossos resultados podem refletir uma resposta protetora da superfície ocular à inflamação ocular relacionada à DA e à doença do olho seco associada.
2. As células epiteliais da conjuntiva bulbar de indivíduos saudáveis apresentam CLD1 como já esperado, e FLG, relato inédito na literatura.
3. Existe uma relação entre os testes clínicos de avaliação da superfície ocular e o percentual da proteína FLG na conjuntiva de pacientes com DA. Houve correlação negativa entre o percentual da FLG com a coloração por fluoresceína e correlação positiva e significativa com o TRFL. Tais achados corroboram para o papel protetor da FLG.
4. Houve aumento dos níveis de transcritos de RNAm nas células da conjuntiva dos pacientes com DA que apresentaram fibrose conjuntival.
5. Não houve correlação entre os sintomas relacionados às manifestações oculares da DA e o perfil das proteínas FLG e CLD1.
6. Não houve correlação entre a gravidade da DA e o perfil das proteínas FLG e CLD1.

7. Anexos

7.1. Parecer do comitê de ética e pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS FILAGRINA E CLAUDINA NA SUPERFÍCIE OCULAR DE PACIENTES PORTADORES DE DERMATITE ATÓPICA.
Pesquisador Responsável: DRA. RUTH MIYUKI SANTO **Versão:** 1
Pesquisador Executante: THAIS MARIA PINHEIRO CALLOU **CAAE:** 49999515.7.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: DRA. RUTH MIYUKI SANTO
Instituição: HCFMUSP
Departamento: OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 14066

Número do Parecer: 1.291.315

Data da Relatoria: 21/10/2015

Apresentação do Projeto: Neste protocolo os pesquisadores pretendem avaliar as proteínas Filagrina e Claudina na superfície ocular de pacientes portadores de dermatite atópica. Serão avaliados, no período de outubro de 2015 a setembro de 2016, no Ambulatório de Córnea e Doenças Externas, 50 pacientes sendo 25 pacientes no grupo controle, sem qualquer risco de possuirem dermatite atópica ou qualquer outra doença em superfície ocular e 25 com dermatite atópica. O projeto está claro e apresenta relevância na área médica. A metodologia está adequada para proposta do estudo e não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa: Os pesquisadores apresentam como proposta do estudo a determinação da presença das proteínas filagrina e claudina na conjuntiva dos pacientes saudáveis, através de análise imuno-histoquímica, e avaliar o perfil dessas proteínas na superfície ocular dos pacientes portadores de dermatite atópica. Seus objetivos estão claros e pertinentes ao desenho da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Neste estudo, não há benefício direto para o sujeito da pesquisa, pois trata-se de um experimento que irá avaliar a hipótese de que os pacientes portadores de dermatite atópica (doença na pele) apresentam alterações importantes na superfície ocular.

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é relevante na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE está de acordo com as normas desta comissão.

Recomendações: Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Recomendamos sua aprovação.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 21 de outubro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

7.2. 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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS FILAGRINA E CLAUDINA NA SUPERFÍCIE OCULAR DE PACIENTES PORTADORES DE DERMATITE ATÓPICA.**

2. PESQUISADOR : **Profa. Dra Ruth Miyuki Santo**

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA ASSISTENTE I CREMESP: 57390

3. UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Oftalmológica HCFMUSP

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

5. DURAÇÃO DA PESQUISA : **12 meses**

TCLE Projeto Análise imunohistoquímica X Dermatite atópica versão 10 08 2015

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

1 – Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar a superfície dos olhos de pacientes saudáveis e de pacientes com dermatite atópica (doença na pele, causada por alergia, muito comum no Brasil e no mundo).

2 – Serão realizados os seguintes procedimentos:

2.1 **Medida da visão :** com e sem óculos, utilizando uma tabela com letras maiores e menores (Tabela de Snellen) e distância padrão de 6 metros.

2.2. **Avaliação das estruturas dos olhos e da quantidade de lágrima nos olhos:** utilizando um aparelho que possui uma lâmpada que ilumina os olhos e facilita a observação. (Lâmpada de fenda)
2.3. **Avaliação dos sintomas oculares**. Os pacientes serão interrogados pelo autor sobre a presença de coçeira, intolerância a luz e lacrimejamento.
2.4. **Colírios coloridos:** dois colírios com cores diferentes (rosa bengala e fluoresceína) serão colocados apenas uma vez em cada olho. Após isso, será feita avaliação dos olhos na mesma lâmpada de fenda.
2.5. **Tempo de ruptura do filme lacrimal:** será avaliado o tempo em e o paciente mantém o colírio colorido na superfície do olho. O paciente apenas precisará piscar e deixar os olhos abertos alguns segundos após a colocação dos colírios coloridos.
2.6. **Medida da produção de lágrima nos olhos. (Teste de Schirmer I):** será realizada a colocação de uma pequena tira de papel na pálpebra inferior. Os pacientes permanecerão com os olhos fechados durante o exame. Após 5 minutos, o papel será retirado.
2.7. **Coleta de células da parte branca do olho. (Citologia de Impressão):** um pequeno papel adesivo será levemente encostado na parte branca do olho após colocação de um colírio anestésico.

3 – Todos os procedimentos apresentam risco mínimo ao paciente. O paciente poderá apresentar desconforto discreto e passageiro após realização da citologia de impressão e dos testes com os colírios coloridos.

4 – Neste estudo, não há benefício direto para o participante. Trata-se de experimento, testando a hipótese de que os pacientes portadores de dermatite atópica (doença na pele) apresentam alterações importantes na superfície ocular.

5 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a **Profa. Dra Ruth Miyuki Santo** e a investigadora executante é a **Dra. Thais Maria Pinheiro Callou** que poderão ser encontradas no Ambulatório de Oftalmologia HCFMUSP – Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 – 6º andar, Bloco 8 - Bairro Cerqueira César - São Paulo, Capital - CEP 05403-000 – Fone: 11 2661.6213. Contato para emergência 24 horas - Enfermaria da Oftalmologia 11 2661.6287. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661.6442 ramais 16, 17 e 18 , FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

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

6 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 - O pesquisador assegura a utilização dos dados e do material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS FILAGRINA E CLAUDINA NA SUPERFÍCIE OCULAR DE PACIENTES PORTADORES DE DERMATITE ATÓPICA.**"

Eu discuti com a **Dra Thais Maria Pinheiro Callou** 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, semi-analfabetos 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 _____/_____/_____

TCLE Projeto Análise imunohistoquímica X Dermatite atópica versão 10 08 2015

7.3. Ficha de avaliação

PROTOCOLO: DERMATITE ATÓPICA E SUPERFÍCIE OCULAR

Data: _____/_____/_____
Nome:
RGHC: Sexo: M F
Data de nascimento: Idade:
Profissão: Fone:

Classificação da dermatite atópica (EASI):_____
( ) Doença ocular prévia/atual? Qual?
( ) Doença na córnea prévia/atual? Qual?
( ) Cirurgia ocular prévia/atual? Qual?
( ) Doença sistêmica? ( ) AR ( ) DM ( ) SSJ ( )SS ( ) Outras:
( ) Medicação sistêmica (últimos 30 dias) Qual?
( ) Medicação ocular (últimos 30 dias) Qual?
( ) LC (últimos 30 dias) ( ) Já usou. Qual? Período:
( ) Outros

Avaliação dos sintomas oculares:

Interrogatório:

- Prurido nos olhos	0 1 2 3 4 5	0 – sem sintomas
- Prurido nas pálpebras	0 1 2 3 4 5	1 - sintoma muito leve
- Fotofobia	0 1 2 3 4 5	2 – sintoma leve
- Lacrimejamento	0 1 2 3 4 5	3 – sintoma moderado
		4 – sintoma intenso
		5 - sintoma muito intenso

AV (cc):

OD	
OE	

Conjuntiva	OD	OE
Filamentos	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Hiperemia	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Hipertrofia papilar	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Fibrose conjuntival	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Outros achados:		

0 – sem sinais
1 - sinal muito leve
2 – sinal leve
3 – sinal moderado
4 – sinal intenso
5 - sinal muito intenso

Pálpebras	OD	OE
Linha de Dennie	Presente ( ) Ausente ( )	Presente ( ) Ausente ( )
Hiperpigmentaçao cutânea periocular.	Presente ( ) Ausente ( )	Presente ( ) Ausente ( )

Pálpebras	OD superior	OE superior	OD inferior	OE inferior
Eczema	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Perda lateral de super-cílios	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Entrópio	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Ectrópio	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Ptose	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Fissuras.	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Inflamação/hiperemia de bordo palpebral	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Muco	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Outros:	0 1 2 3 4	0 1 2 3 4	0 1 2 3 4	0 1 2 3 4

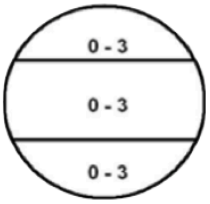
Córnea	OD	OE
Opacidades (nubéculas, leucomas,outras cicatrizes)	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Neovascularização	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Pontos de Horner Trantas	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Pterígio	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5
Outros:	0 1 2 3 4 5	0 1 2 3 4 5

Outros achados biomicroscópicos:
Fundoscopia:
PIO:

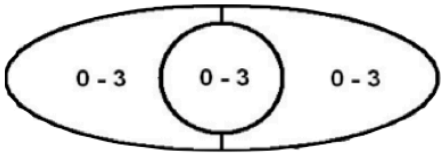
Pentacam: Realizado ( ) Não realizado ( ) Motivo:
Questionário – OSDI (Em anexo): Realizado ( ) Não realizado ( )
Citologia de Impressão Realizada ( ) Não realizada ( )

OD:
TRFL:___/___/___ segundos.
Schirmer I: _____ mm

Fluoresceína

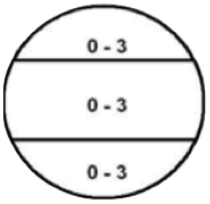


Rosa Bengala

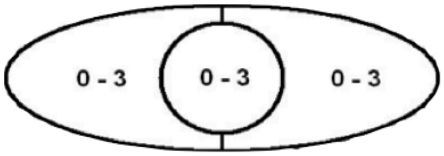


OE:
TRFL:___/___/___ segundos.
Schirmer I: _____ mm

Fluoresceína



Rosa Bengala



7.4. OSDI

R.M. Santo et al. / Journal of Clinical Epidemiology 68 (2015) 370–378

Appendix

Cultural adapted Brazilian–Portuguese version of the OSDI

Responda as perguntas abaixo e marque com um X a resposta que o senhor/senhora acha a mais correta.

Nos últimos 7 (sete) dias, você teve algumas dessas sensações:

		O tempo todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)
1	Olhos sensíveis à luz?					
2	Sensação de areia nos olhos?					
3	Dor ou irritação nos olhos?					
4	Visão embaçada?					
5	Olhos pesados ou cansados?					

Nos últimos 7 (sete) dias, por causa dos problemas nos seus olhos, o senhor/senhora teve dificuldades para realizar as seguintes tarefas - *mesmo quando estava usando óculos*:

		O tempo todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)	Não realizei esta atividade
6	Ler?						
7	Dirigir ou ver nome do ônibus à noite?						
8	Trabalhar com o computador ou usar caixa eletrônico?						
9	Assistir à TV?						

Nos últimos 7 (sete) dias, seus olhos incomodaram o senhor/senhora em alguma destas situações:

		O tempo todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)	Não estive em lugar assim na semana que passou
10	Lugares com vento?						
11	Lugares muito secos ou com pó?						
12	Lugares com ar-condicionado?						

Ocular Surface Disease Index© (OSDI©)[2]

Ask your patients the following 12 questions, and circle the number in the box that best represents each answer. Then, fill in boxes A, B, C, D, and E according to the instructions beside each.

Have you experienced any of the following *during the last week?*	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time
1. Eyes that are sensitive to light? . .	4	3	2	1	0
2. Eyes that feel gritty?	4	3	2	1	0
3. Painful or sore eyes?	4	3	2	1	0
4. Blurred vision?	4	3	2	1	0
5. Poor vision?	4	3	2	1	0

Subtotal score for answers 1 to 5 (A)

Have problems with your eyes limited you in performing any of the following *during the last week?*	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	N/A
6. Reading?	4	3	2	1	0	N/A
7. Driving at night?	4	3	2	1	0	N/A
8. Working with a computer or bank machine (ATM)?	4	3	2	1	0	N/A
9. Watching TV?	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 6 to 9 (B)

Have your eyes felt uncomfortable in any of the following situations *during the last week?*	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	N/A
10. Windy conditions?	4	3	2	1	0	N/A
11. Places or areas with low humidity (very dry)?	4	3	2	1	0	N/A
12. Areas that are air conditioned? . . .	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 10 to 12 (C)

Add subtotals A, B, and C to obtain D
(D = sum of scores for all questions answered) (D)

Total number of questions answered
(do not include questions answered N/A) (E)

Please turn over the questionnaire to calculate the patient's final OSDI© score.

Evaluating the OSDI© Score[1]

The OSDI© is assessed on a scale of 0 to 100, with higher scores representing greater disability. The index demonstrates sensitivity and specificity in distinguishing between normal subjects and patients with dry eye disease. The OSDI© is a valid and reliable instrument for measuring dry eye disease (normal, mild to moderate, and severe) and effect on vision-related function.

Assessing Your Patient's Dry Eye Disease[1, 2]

Use your answers D and E from side 1 to compare the sum of scores for all questions answered (D) and the number of questions answered (E) with the chart below.* Find where your patient's score would fall. Match the corresponding shade of red to the key below to determine whether your patient's score indicates normal, mild, moderate, or severe dry eye disease.

Number of Questions Answered (E from Side 1)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	48
12	10.4	20.8	31.3	41.7	52.1	62.5	72.9	83.3	93.8	100.0
11	11.4	22.7	34.1	45.5	56.8	68.2	79.5	90.9	100.0	
10	12.5	25.0	37.5	50.0	62.5	75.0	87.5	100.0		
9	13.9	27.8	41.7	55.6	69.4	83.3	97.2			
8	15.6	31.3	46.9	62.5	78.1	93.8	100.0			
7	17.9	35.7	53.6	71.4	89.3	100.0				
6	20.8	41.7	62.5	83.3	100.0					
5	25.0	50.0	75.0	100.0						
4	31.3	62.5	93.8							
3	41.7	83.3								
2	62.5									
1										

Sum of Scores for All Questions Answered (D from Side 1)

*Values to determine dry eye severity calculated using the OSDI© formula.

$$\text{OSDI©} = \frac{(\text{sum of scores}) \times 25}{(\text{\# of questions answered})}$$

Normal — Mild — Moderate — Severe

Patient's Name: _____ Date: _____

How long has the patient experienced dry eye disease? _____

Eye Care Professional's Comments: _____

1. Data on file, Allergan, Inc.
2. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:615-621

Copyright © 1995, Allergan

8. Referências

1. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. J Eur Acad Dermatol. 2018;32(5):657-82.
2. 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(1):68-73.
3. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI, Group IPTS. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. J Allergy Clin Immunol. 2009;124(6):1251-8.
4. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, 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(2):338-51.
5. Mancini AJ, Kaulback K, Chamlin SL. The socioeconomic impact of atopic dermatitis in the United States: a systematic review. Pediatr Dermatol. 2008;25(1):1-6.
6. Yang EJ, Beck KM, Sekhon S, Bhutani T, Koo J. The impact of pediatric atopic dermatitis on families: A review. Pediatric Dermatology. 2019;36(1):66-71.
7. Furue M, Ulzii D, Vu YH, Tsuji G, Kido-Nakahara M, Nakahara T. Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Current Paradigm. Iran J Immunol. 2019;16(2):97-107.
8. David Boothe W, Tarbox JA, Tarbox MB. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. Adv Exp Med Biol. 2017;1027:21-37.
9. Werfel T, Allam JP, Biedermann T, Eyerich K, Gilles S, Guttman-Yassky E, et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2016;138(2):336-49.
10. Orfali RL, Zaniboni MC, Aoki V. Profile of skin barrier proteins and cytokines in adults with atopic dermatitis. G Ital Dermatol Venereol. 2017;152(2):140-7.
11. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2011;127(3):773-86.
12. Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, et al. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29(6):1091-5.
13. Kathuria P, Silverberg JI. Association of pollution and climate with atopic eczema in US children. Pediatr Allergy Immunol. 2016;27(5):478-85.
14. Baurecht H, Ruhlemann MC, Rodriguez E, Thielking F, Harder I, Erkens AS, et al. Epidermal lipid composition, barrier integrity, and eczematous inflammation are associated with skin microbiome configuration. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2018;141(5):1668.
15. 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.
16. Beck LA, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin J, Gallo R, et al. Phenotype of atopic dermatitis subjects with a history of eczema herpeticum. J Allergy Clin Immunol. 2009;124(2):260-9.
17. Orfali RL, Oliveira LMD, de Lima JF, de Carvalho GC, Ramos YAL, Pereira NZ, et al. Staphylococcus aureus enterotoxins modulate IL-22-secreting cells in adults with atopic dermatitis. Scientific Reports. 2018;8(1):6665.

18. Silverberg JI, Hanifin J, Simpson EL. Climatic factors are associated with childhood eczema prevalence in the United States. J Invest Dermatol. 2013;133(7):1752-9.
19. Hassoun Y, James C, Bernstein DI. The Effects of Air Pollution on the Development of Atopic Disease. Clin Rev Allergy Immunol. 2019.
20. Kabashima K, Otsuka A, Nomura T. Linking air pollution to atopic dermatitis. Nat Immunol. 2016;18(1):5-6.
21. Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. J Am Acad Dermatol. 1993;28(5 Pt 1):719-23.
22. Irvine AD, McLean WH. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 2006;126(6):1200-2.
23. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. N Engl J Med. 2011;365(14):1315-27.
24. Liang Y, Chang C, Lu Q. The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms. Clin Rev Allergy Immunol. 2016;51(3):315-28.
25. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic Features of Atopic-Dermatitis. Acta Derm-Venereol. 1980:44-7.
26. Vakharia PP, Chopra R, Silverberg JI. Systematic Review of Diagnostic Criteria Used in Atopic Dermatitis Randomized Controlled Trials. Am J Clin Dermatol. 2018;19(1):15-22.
27. Suzuki N, Nagao M, Hoshi M, Imakiire R, Kobori T, Fujisawa T. High prevalence of nasal allergy development in infants with atopic dermatitis and/or food allergy: A prospective cohort study. Allergy. 2019;74:650.
28. Silverberg JI. Comorbidities and the impact of atopic dermatitis. Ann Allergy Asthma Immunol. 2019; 123(2): 144-151.
29. Sun D, Ong PY. Infectious Complications in Atopic Dermatitis. Immunol Allergy Clin North Am. 2017;37(1):75-93.
30. Schonmann Y, Mansfield KE, Hayes JF, Abuabara K, Roberts A, Smeeth L, et al. Atopic eczema in adulthood and risk of depression and anxiety: a population-based cohort study. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019;2213-2198(19):130753-6.
31. Strom MA, Fishbein AB, Paller AS, Silverberg JI. Association between atopic dermatitis and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children and adults. Br J Dermatol. 2016;175(5):920-9.
32. Andersen YM, Egeberg A, Gislason GH, Skov L, Thyssen JP. Autoimmune diseases in adults with atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2017;76(2):274-80.
33. Ruff S, Egeberg A, Andersen YMF, Gislason G, Skov L, Thyssen JP. Prevalence of Cancer in Adult Patients with Atopic Dermatitis: A Nationwide Study. Acta Derm Venereol. 2017;97(9):1127-9.
34. Nahm DH. Associations of Atopic Dermatitis With Obesity and Unmarried Status in Young Adults: Evidence for Atopic Dermatitis as a Life-Style Disorder With High Social Impact. Allergy Asthma Immunol Res. 2016;8(2):89-91.
35. Standl M, Tesch F, Baurecht H, Rodriguez E, Muller-Nurasyid M, Gieger C, et al. Association of Atopic Dermatitis with Cardiovascular Risk Factors and Diseases. J Invest Dermatol. 2017;137(5):1074-81.
36. Govind K, Whang K, Khanna R, Scott AW, Kwatra SG. Atopic dermatitis is associated with increased prevalence of multiple ocular comorbidities. J Aller Cl Imm-Pract. 2019;7(1):298-9.

37. Jabbehdari S, Starnes TW, Kurji KH, Eslani M, Cortina MS, Holland EJ, et al. Management of advanced ocular surface disease in patients with severe atopic keratoconjunctivitis. Ocul Surf. 2018;17(2):303-309.
38. Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(6):1019-32.
39. Guglielmetti S, Dart JK, Calder V. Atopic keratoconjunctivitis and atopic dermatitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2010;10(5):478-85.
40. Patel N, Venkateswaran N, Wang Z, Galor A. Ocular involvement in atopic disease: a review. Curr Opin Ophthalmol. 2018;29(6):576-81.
41. Thyssen JP, Toft PB, Halling-Overgaard AS, Gislason GH, Skov L, Egeberg A. Incidence, prevalence, and risk of selected ocular disease in adults with atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2017;77(2):280-6.
42. Maier P, Lapp T, Reinhard T. Ocular involvement in atopic dermatitis : Clinical aspects and therapy. Ophthalmologe. 2017;114(6):514-24.
43. Kothari N, Young RC, Read SP, Tutiven J, Perez VL, Flynn HW, Jr., et al. Retinal Detachment Associated With Atopic Dermatitis. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina. 2017;48(6):513-7.
44. Govind K, Whang K, Khanna R, Scott AW, Kwatra SG. Atopic dermatitis is associated with increased prevalence of multiple ocular comorbidities. J Allergy Clin Immunol Pract. 2019;7(1):298-9.
45. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. Ocul Surf. 2017;15(3):334-65.
46. Zhang L, Mercado C, Galor A, Holland EJ, Wang G, Karp CL. Challenging Treatment of Ocular Surface Squamous Neoplasia in Patients with Atopic Disease. Ocul Immunol Inflamm. 2019;27(2): 288-293.
47. Takakuwa K, Hamanaka T, Mori K, Chin S, Shinmei Y, Funaki T, et al. Atopic Glaucoma: Clinical and Pathophysiological Analysis. J Glaucoma. 2015;24(9):662-8.
48. Tuft SJ, Ramakrishnan M, Seal DV, Kemeny DM, Buckley RJ. Role of Staphylococcus aureus in chronic allergic conjunctivitis. Ophthalmology. 1992;99(2):180-4.
49. Bielory B, Bielory L. Atopic dermatitis and keratoconjunctivitis. Immunol Allergy Clin North Am. 2010;30(3):323-36.
50. Hogan MJ . Atopic keratoconjunctivitis. Trans Am Ophthalmol Soc. 1952;50:265-81.
51. Foster CS, Calonge M. Atopic keratoconjunctivitis. Ophthalmology. 1990;97(8):992-1000.
52. Bremond-Gignac D, Nischal KK, Mortemousque B, Gajdosova E, Granet DB, Chiambaretta F. Atopic Keratoconjunctivitis in Children: Clinical Features and Diagnosis. Ophthalmology. 2016;123(2):435-7.
53. Montagna W. Comparative anatomy and physiology of the skin. Arch Dermatol. 1967;96(4):357-63.
54. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin Dermatol. 2012;30(3):257-62.
55. Marks R. The stratum corneum: a moving subject. Br J Dermatol. 2014;171 Suppl 3:10-2.
56. Kezic S, Jakasa I. Filaggrin and Skin Barrier Function. Curr Probl Dermatol. 2016;49:1-7.

57. 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.
58. Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. J Invest Dermatol. 2008;128(8):2117-9.
59. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nat Genet. 2006;38(4):441-6.
60. Loset M, Brown SJ, Saunes M, Hveem K. Genetics of Atopic Dermatitis: From DNA Sequence to Clinical Relevance. Dermatology. 2019;235(5):355-64.
61. Yu HS, Kang MJ, Jung YH, Kim HY, Seo JH, Kim YJ, et al. Mutations in the Filaggrin are Predisposing Factor in Korean Children With Atopic Dermatitis. Allergy Asthma Immunol Res. 2013;5(4):211-5.
62. 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.
63. Mocsai G, Gaspar K, Nagy G, Irinyi B, Kapitany A, Biro T, et al. Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2014;170(3):617-24.
64. Koseki R, Morii W, Noguchi E, Ishikawa M, Yang L, Yamamoto-Hanada K, et al. Effect of filaggrin loss-of-function mutations on atopic dermatitis in young age: a longitudinal birth cohort study. J Hum Genet. 2019;64(9):911-7.
65. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(4):285-93.
66. Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. Am J Physiol. 11998; 274(1):1-9.
67. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS Lett. 2011;585(4):606-12.
68. Morita K, Miyachi Y, Furuse M. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. Eur J Dermatol. 2011;21(1):12-7.
69. De Benedetto A, Latchney LR, McGirt LY, Vidyasagar S, Cheadle C, Barnes KC, et al. The tight junction protein, Claudin-1 is dysregulated in atopic dermatitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2008;121(2):32.
70. Asad S, Winge MC, Wahlgren CF, Bilcha KD, Nordenskjold M, Taylan F, et al. The tight junction gene Claudin-1 is associated with atopic dermatitis among Ethiopians. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016;30(11):1939-41.
71. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. Immunol Rev. 2011;242(1):233-46.
72. Leong YY, Tong L. Barrier function in the ocular surface: from conventional paradigms to new opportunities. Ocul Surf. 2015;13(2):103-9.
73. Pfister RR. The normal surface of conjunctiva epithelium. A scanning electron microscopic study. Invest Ophthalmol. 1975;14(4):267-79.
74. Krenzer KL, Freddo TF. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997;38(1):142-52.
75. Mantelli F, Mauris J, Argueso P. The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2013;13(5):563-8.

76. Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S. Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(5):2103-8.
77. 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.
78. Orfali RL, Sato MN, Santos VG, Titz TO, Brito CA, Duarte AJS, et al. Staphylococcal enterotoxin B induces specific IgG4 and IgE antibody serum levels in atopic dermatitis. Int J Dermatol. 2015;54(8):898-904.
79. Santo RM, Ribeiro-Ferreira F, Alves MR, Epstein J, Novaes P. Enhancing the cross-cultural adaptation and validation process: linguistic and psychometric testing of the Brazilian-Portuguese version of a self-report measure for dry eye. J Clin Epidemiol. 2015;68(4):370-8.
80. Van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. Arch Ophthalmol. 1969;82(1):10-4.
81. Shapiro A, Merin S. Schirmer test and break-up time of tear film in normal subjects. Am J Ophthalmol. 1979;88(4):752-7.
82. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. Effect of Fluorescein Instillation on the Pre-Corneal Tear Film Stability. Current Eye Research. 1985;4(1):9-12.
83. Peyret-Lacombe A, Duplan H, Watts M, Charveron M, Brunel G. Antimicrobial peptide modulation in a differentiated reconstructed gingival epithelium. Cell Tissue Res. 2007;328(1):85-95.
84. Contreras-Ruiz L, Schulze U, Garcia-Posadas L, Arranz-Valsero I, Lopez-Garcia A, Paulsen F, et al. Structural and functional alteration of corneal epithelial barrier under inflammatory conditions. Curr Eye Res. 2012;37(11):971-81.
85. Fillagrin - Multifunctional Protein. Acta Med Croatica. 2016;70(2):125-30.
86. Lapp T, Auw-Haedrich C, Reinhard T, Evans R, Rodriguez E, Weidinger S, et al. Analysis of filaggrin mutations and expression in corneal specimens from patients with or without atopic dermatitis. Int Arch Allergy Immunol. 2014;163(1):20-4.
87. Lund AS, Heegaard S, Prause JU, Toft PB, Skov L. Expression of filaggrin in normal and keratinized conjunctiva. Open Ophthalmol J. 2012;6:137-40.
88. Nakamura T, Nishida K, Dota A, Matsuki M, Yamanishi K, Kinoshita S. Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(3):549-56.
89. Greisenegger E, Novak N, Maintz L, Bieber T, Zimprich F, Haubenberger D, et al. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010;24(5):607-10.
90. Soria J, Acera A, Duran JA, Boto-de-los-Bueis A, Del-Hierro-Zarzuelo A, Gonzalez N, et al. The analysis of human conjunctival epithelium proteome in ocular surface diseases using impression cytology and 2D-DIGE. Experimental Eye Research. 2018;167:31-43.
91. Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, Funaki T, Asada Y, Yokoi N, et al. Filaggrin mutations are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. Br J Ophthalmol. 2012;96(9):1272-3.
92. Gruber R, Bornchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, et al. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. Am J Pathol. 2015;185(10):2777-89.

93. Kinoshita S, Nakamura T, Nishida K. Pathological keratinization of ocular surface epithelium. Adv Exp Med Biol. 2002;506(Pt A):641-6.
94. Ozaki A, Otani T, Kitagawa N, Ogata K, Iida H, Kojima H, et al. Serum affects keratinization and tight junctions in three-dimensional cultures of the mouse keratinocyte cell line COCA through retinoic acid receptor-mediated signaling. Histochem Cell Biol. 2019;151(4):315-26.
95. Dogan AS, Onder E, Arikok AT, Bicer T, Gurdal C. Claudin-1 expressions decrease in pterygium with respect to normal conjunctiva. Cutan Ocul Toxicol. 2016;35(4):315-8.
96. Wang G, Dong N, Wang Y, Li J, Dong F, Jeyalatha V, et al. Epithelial dysplasia in pterygium postoperative granuloma. Exp Eye Res. 2018;175:199-206.
97. Hu Y, Matsumoto Y, Dogru M, Okada N, Igarashi A, Fukagawa K, et al. The differences of tear function and ocular surface findings in patients with atopic keratoconjunctivitis and vernal keratoconjunctivitis. Allergy. 2007;62(8):917-25.
98. Lee SH, Lee SH, Lee SH, Park YL. Cataract, Glaucoma, and Dry Eye Disease in Adults with Atopic Dermatitis: A Nationwide Cross-Sectional Study from the Republic of Korea. Annals of Dermatology. 2019;31(1):37-43.
99. Droitcourt C, Touboul D, Ged C, Ezzedine K, Cario-Andre M, de Verneuil H, et al. A prospective study of filaggrin null mutations in keratoconus patients with or without atopic disorders. Dermatology. 2011;222(4):336-41.
100. Ibrahim OMA, Dogru M, Kaido M, Kojima T, Fujishima H, Tsubota K. Functional Visual Acuity Assessment of Severe Atopic Keratoconjunctivitis. Cornea. 2014;33:13-18.
101. Merdler I, Hassidim A, Sorkin N, Shapira S, Gronovich Y, Korach Z. Keratoconus and allergic diseases among Israeli adolescents between 2005 and 2013. Cornea. 2015;34(5):525-9.
102. Sehgal VN, Jain S. Atopic dermatitis: ocular changes. Int J Dermatol. 1994;33(1):11-5.
103. Beck KM, Seitzman GD, Yang EJ, Sanchez IM, Liao W. Ocular Co-Morbidities of Atopic Dermatitis. Part I: Associated Ocular Diseases. Am J Clin Dermatol. 2019.
104. Akinlade B, Guttman-Yassky E, de Bruin-Weller M, Simpson EL, Blauvelt A, Cork MJ, et al. Conjunctivitis in dupilumab clinical trials. Br J Dermatol. 2019;181(3):459-473.
105. Aszodi N, Thurau S, Seegraber M, de Bruin-Weller M, Wollenberg A. Management of dupilumab-associated conjunctivitis in atopic dermatitis. J Dtsch Dermatol Ges. 2019;17(5):488-91.
106. Wollenberg A, Ariens L, Thurau S, van Luijk C, Seegraber M, de Bruin-Weller M. Conjunctivitis occurring in atopic dermatitis patients treated with dupilumab-clinical characteristics and treatment. J Aller Cl Imm-Pract. 2018;6(5):1778.
107. Friedlaender MH. Ocular allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11(5):477-82.
108. Friedlaender MH. Corneal findings in ocular allergy. Int Ophthalmol Clin. 1998;38(4):39-46.
109. Yokoi K, Yokoi N, Kinoshita S. Impairment of ocular surface epithelium barrier function in patients with atopic dermatitis. Brit J Ophthalmol. 1998;82(7):797-800.
110. Zhan H, Smith L, Calder V, Buckley R, Lightman S. Clinical and immunological features of atopic keratoconjunctivitis. Int Ophthalmol Clin. 2003;43(1):59-71.
111. Stahl JL, Barney NP. Ocular allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2004;4(5):455-9.

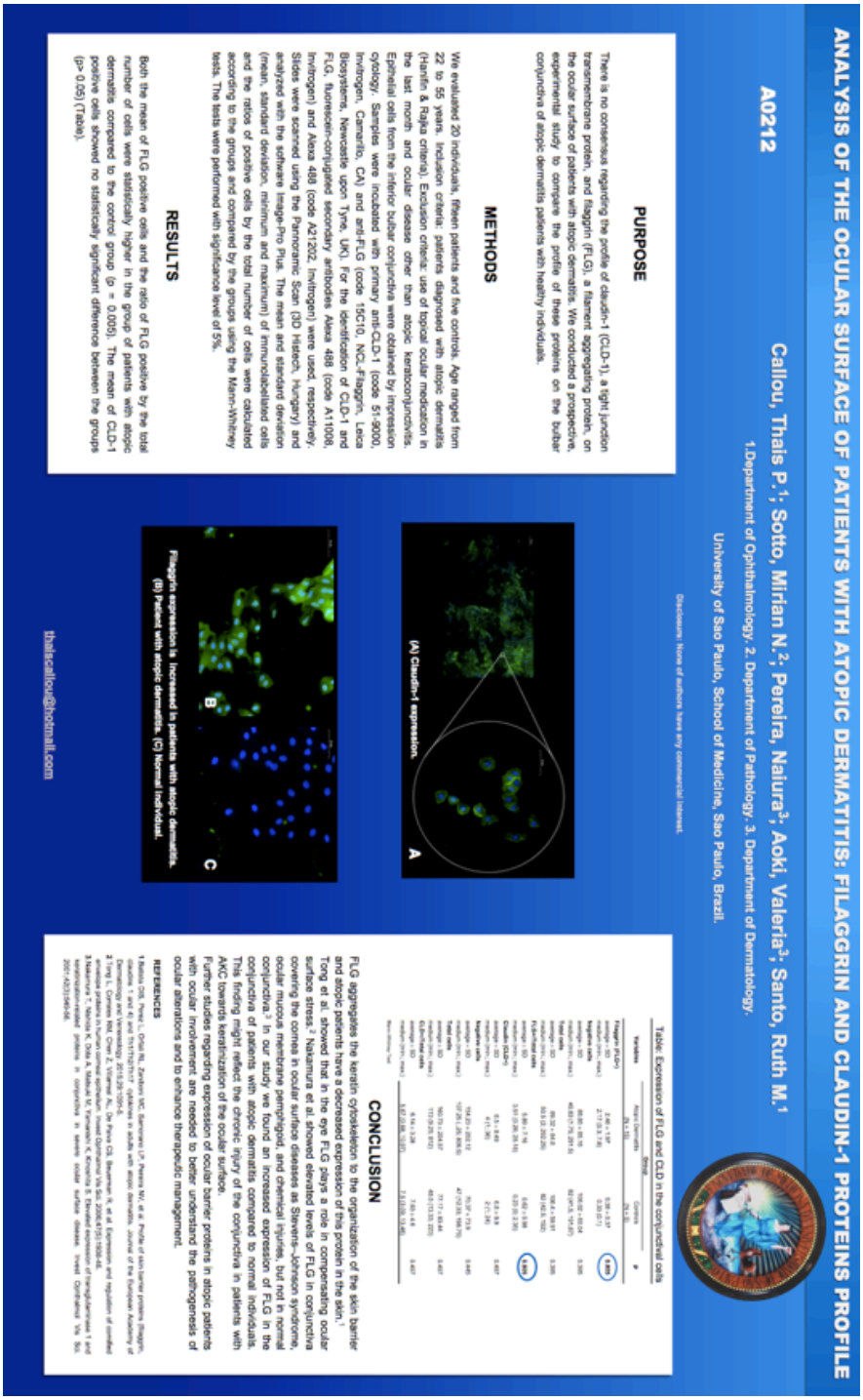
112. Vaneckova J, Bukac J. The severity of atopic dermatitis and the relation to the level of total IgE, onset of atopic dermatitis and family history about atopy. Food Agr Immunol. 2016;27(5):734-41.
113. Trzeciak M, Glen J, Bandurski T, Sokolowska-Wojdylo M, Wilkowska A, Roszkiewicz J. Relationship between serum levels of interleukin-18, IgE and disease severity in patients with atopic dermatitis. Clinical and Experimental Dermatology. 2011;36(7):728-32.
114. Varlamov E, Pampura A, Okuneva T. Relationship between specific IgE to food allergens and severity atopic dermatitis at infants. Allergy. 2008;63:644-5.
115. Tuft SJ, Kemeny DM, Dart JK, Buckley RJ. Clinical features of atopic keratoconjunctivitis. Ophthalmology. 1991;98(2):150-8.
116. Stout TE, McFarland T, Mitchell JC, Appukuttan B, Stout JT. Recombinant Filaggrin Is Internalized and Processed to Correct Filaggrin Deficiency. Journal of Investigative Dermatology. 2014;134(2):423-9.
117. Parker MA, McFarland TJ, Hartzell M, Stout JT. Topical application of recombinant filaggrin restores the skin barrier function in filaggrin-deficient mice. Journal of Investigative Dermatology. 2014;134:65.

Apêndice

Apresentações em Congressos

- ARVO *(Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. Baltimore, Maryland, USA*. Maio, 2017.

Analysis of the ocular surface of patients with atopic dermatitis: filaggrin and claudin-1 proteins profile.



- ISAD. *International Symposium on Atopic Dermatitis. Sao Paulo, SP, Brazil*. Maio, 2016.

Ocular surface profile in patients with atopic dermatitis.

OCULAR SURFACE PROFILE IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

Thais Maria Pinheiro Callou; Brenda Chinecchio; Ana Paula Chaves; Fernando Eij Sakassegawa Naves; Ricardo Gomes Braga de Magalhães; Richard Yudi Hida; Ricardo Holzchuh; Ruth Miyuki Santo.

University of Sao Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

PORPOSE

The aim of this study is to analyze the ocular surface profile in patients with atopic dermatitis.

METHODS

- 66 eyes of 33 patients with atopic dermatitis from the Department of Dermatology were examined.
- General Hospital of the University of São Paulo, School of Medicine, São Paulo, Brazil.
- Ocular surface profile outcome measurements.

-Tear film break-up time (BUT)

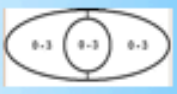
Measures tear film stability.

- Schirmer I test

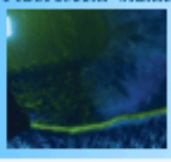
Measures the tear production.

- Rose Bengal staining score.

(Van Bijsterveld)



- Fluorescein staining score.



RESULTS

- In the present group, the patients showed only mild findings in ocular surface.

	average	SD	Normal value
Schirmer I (mm)	15,22	8,49	10 mm
BUT (seconds)	8,59	2,9	10 seconds

	average	SD
Rose Bengal	0,67	0,76
Fluorescein	0,76	0,89

DISCUSSION

-Abnormal Schirmer I - Antihistamines medications can cause reduction in tear production.

-Abnormal BUT - Tear film lipid layer deficiency.

-Lipid layer deficiency is common in atopic dermatitis due to:

> High meibomian gland disfuncion due to eyelid abnormalities;

> High colonization by *Staphylococcus aureus.*

- Tear film dysfunccion is not the only cause of ocular surface damage in patients with atopic dermatitis.

CONCLUSION

Patients with atopic dermatitis can show mild chronic signs of ocular surface damage, however, tear production and ocular surface stability are within normal values.

- Atopic dermatitis beyond the skin – a review on the ocular surface epithelial barrier.

Clinics Journal.

CLINICS

ATOPIC DERMATITIS BEYOND THE SKIN - A REVIEW ON THE OCULAR SURFACE EPITHELIAL BARRIER

Journal:	*CLINICS*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Callou, Thais; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Ophthalmology Orfali, Raquel; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Dermatology Zaniboni, Mariana; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Dermatology Aoki, Valeria; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Dermatology Santo, Ruth; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Ophthalmology
Keyword - Click <A HREF='http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html' target="_blank">here to find your MeSH terms.:	Keratoconjunctivitis, Dermatitis, Atopic, Filaggrin, Claudins

Analysis of the ocular surface of patients with atopic dermatitis discloses increased expression of filaggrin and claudin-1, key components of the epithelial barrier.

The Ocular Surface.

Manuscript Details

Manuscript number	THEOCULARSURFACE_2019_295
Title	Analysis of the ocular surface of patients with atopic dermatitis discloses increased expression of filaggrin and claudin-1, key components of the epithelial barrier.
Short title	Expression of filaggrin and claudin-1 on the ocular surface of patients with atopic dermatitis.
Article type	Research Paper

Abstract

The reduction of filaggrin (FLG) and claudin-1 (CLD-1) in skin epithelial barrier is a remarkable factor in AD pathogenesis. Changes in FLG and CLD-1 expression on the ocular surface of AD patients might also contribute to the development of typical ocular co-morbidities. We aimed to evaluate the profile of FLG and CLD-1 expression on the ocular surface of AD patients and healthy controls correlating to clinical features. Methods: Bulbar conjunctival cells were collected by cellular imprint technique, and FLG and CLD-1 expression was assessed by immunofluorescence (IF) and RT-qPCR. Results: We detected increased expression of FLG and CLD-1, as well as their transcript levels in AD patients compared to controls. There was a negative correlation with fluorescein staining and positive and significant correlation between TBUT and FLG expression. We also found enhanced expression of FLG and CLD-1 in patients with moderate/severe AD compared to mild AD. Conclusions: In the present study, conjunctival epithelial cells of AD patients showed an increased expression of FLG and CLD-1, on both IF and RT-qPCR, in contrast to related cutaneous findings. Our results may reflect a protective response of the ocular surface to AD-related ocular inflammation and associated dry eye disease. We also detected FLG in the conjunctiva of healthy individuals, an unprecedented finding. Further investigations focusing the role of FLG, CLD-1 and other epithelial proteins in ocular surface of AD patients may clarify the pathophysiology of the disease and help develop effective therapies.

Keywords	Atopic dermatitis; Claudin-1; Epithelial barrier; Filaggrin; Immunofluorescence; Keratoconjunctivitis; Ocular surface; Real-Time Polymerase Chain Reaction

Corresponding Author	Ruth Santo
Corresponding Author's Institution	Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR
Order of Authors	Thais Callou, Raquel Leao Orfali, Mirian Sotto, Naiura Pereira, Mariana Zaniboni, Valeria Aoki, Mariane Brito, Monique Matsuda, Ruth Santo

Suggested reviewers	Victor Perez, Carol Karp