

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**JULIANNE ALVES MACHADO**

**Identificação de mutações no gene da filagrina em  
pacientes brasileiros com dermatite atópica: papel na  
gravidade da doença**

**RIBEIRÃO PRETO**  
**2022**  
**JULIANNE ALVES MACHADO**

**Identificação de mutações no gene da filagrina em  
pacientes brasileiros com dermatite atópica: papel na  
gravidade da doença**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências. Versão  
corrigida.

**Área de Concentração:** Clínica Médica.

**Orientadora: Prof. Dra. Luisa Karla  
de Paula Arruda**

**RIBEIRÃO PRETO**  
**2022**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Julianne Alves

Identificação de mutações no gene da filagrina em pacientes brasileiros com dermatite atópica: papel na gravidade da doença. / Julianne Alves Machado; Orientadora, Luisa Karla de Paula Arruda. Ribeirão Preto. - 2022.

58p.: 7il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Clínica Médica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

1. Dermatite atópica. 2. Alergia. 3. Filagrina. 4. Barreira cutânea. 5. Mutação.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aluno:** Julianne Alves Machado

**Título:** Identificação de mutações no gene da filagrina em pacientes brasileiros com dermatite atópica: papel na gravidade da doença

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:** Clínica Médica

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ***Dedicatória***

*Dedico este trabalho a toda minha família, de forma especial aos meus pais Nairson e Selma!*

## ***Agradecimentos***

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre ter me guiado e me permitido conquistar todos os meus objetivos.

À minha orientadora Prof. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos e pela confiança em mim depositada, ao ter me recebido e acolhido de braços abertos em seus projetos e pelos nossos encontros regados de conhecimento e muito incentivo. Sempre um exemplo de pessoa e profissional. Muito orgulho em trabalhar com a senhora.

Às Dras. Janaína Melo, Mariana Ferriani e Thais Nocitti, por terem me incentivado neste projeto, desde os seus primeiros passos até a sua finalização. Serei eternamente grata por ter vocês ao meu lado me ensinando, apoiando e incentivando desde a Residência Médica em Alergia e Imunologia. Além de excelentes profissionais, tenho a honra de chamar de amigas.

À Marina Mendonça, pelo seu excelente trabalho no laboratório e pela paciência em me ensinar e tirar minhas inúmeras dúvidas.

À minha banca examinadora, por aceitar participar da avaliação deste estudo enriquecendo-o com suas contribuições.

Agradeço à minha família, por sempre me apoiar na busca pelos meus sonhos. Meus pais, Nairson e Selma, vocês sempre me ensinaram que o caminho mais valioso a ser seguido é o da educação e eu sempre busquei percorrê-lo com base nos seus ensinamentos. Tudo é por vocês e para vocês!!!

Ao meu namorado Fabrício, que se dispôs a me ajudar sempre que precisei, sempre atencioso e prestativo, companheiro e parceiro.

## ***Apoio Financeiro***

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, cujo apoio financeiro foi imprescindível para a execução deste projeto.*

---

Machado JA. **Identificação de mutações no gene da filagrina em pacientes brasileiros com dermatite atópica: papel na gravidade da doença.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

**Introdução:** Dermatite atópica (DA) é uma dermatose inflamatória, de caráter crônico e recidivante, com alta prevalência mundial, caracterizada por eczema localizado ou generalizado, xerose cutânea e prurido intenso. A filagrina (*Filaggrin, filament aggregating protein*) (*FLG*) é uma proteína estrutural chave que permite a diferenciação terminal da epiderme e a formação da barreira cutânea. Estudos prévios em várias populações demonstraram que mutações com perda de função no gene que codifica *FLG* (cromossomo 1q21) são o fator genético mais importante associado com predisposição à DA. **Objetivos:** Avaliar a frequência de mutações nos genes que codificam *FLG* e filagrina 2 (*FLG2*) em pacientes brasileiros com DA, bem como estudar a possível relação da presença de mutação com a gravidade do quadro. **Pacientes e Métodos:** A presença de mutações R501X e R2447X em *FLG*, e de mutações S2377X e X2392S em *FLG2* foi investigada por PCR e sequenciamento por método de Sanger em 115 pacientes com DA. Os níveis de IgE total e IgE específica para alérgenos de ácaros Der p 1, Der p 2 (de *Dermatophagoides pteroyssinus*); Der f 1, Der f 2 (de *D. farinae*) e Blo t 5 (de *Blomia tropicalis*) foram determinados por ImmunoCAP e ImmunoCAP-ISAC, respectivamente. A gravidade da doença foi avaliada pelo índice SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*). **Resultados:** Presença de mutação em pelo menos um dos genes (*FLG* e/ou *FLG2*) foi encontrada em 47 (40,9%) pacientes com DA. A mutação R501X em *FLG* foi observada em quatro pacientes (3,4%), enquanto que a mutação R2447X não foi identificada em nenhum paciente. A mutação S2377X foi identificada em 45/115 (39,1%) pacientes e a mutação X2392S em um paciente (heterozigoto) que também apresentou a mutação S2377X. A idade dos pacientes e o tempo de doença foram mais elevados nos pacientes com mutação em *FLG* e/ou *FLG2*. De forma não esperada, a gravidade da doença dada pelo SCORAD foi maior em pacientes sem as mutações estudadas. Não foram observadas diferenças significantes com relação a idade de início dos sintomas (mediana 9,4 e 9,5 anos); IgE total; IgE para Der p 1 e Der p 2 entre pacientes com as mutações R501X e/ou S2377X, quando comparados àqueles sem essas mutações, respectivamente. **Conclusões:** Em pacientes brasileiros com DA moderada a grave, a presença da mutação R501X em *FLG* teve frequência baixa e não mostrou associação significativa com parâmetros clínicos e demográficos. Pacientes que apresentaram pelo menos uma mutação nos genes *FLG* e *FLG2* tiveram maior tempo de doença, entretanto tiveram valores menores de SCORAD quando comparados a pacientes sem estas mutações.

**Palavras-chave:** Dermatite atópica. Alergia. Filagrina. Barreira cutânea. Mutação.

---

Machado JA. **Identification of mutations in the Filaggrin gene in Brazilian patients with atopic dermatitis: role in disease severity.** Thesis (Doctorate) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2022.

**Introduction:** Atopic dermatitis (AD) is a chronic and relapsing, inflammatory dermatitis, with high worldwide prevalence, characterized by localized or generalized eczema, cutaneous xerosis and intense itching. Filaggrin (Filament aggregating protein) is a key structural protein that allows the terminal differentiation of the epidermis and the formation of the skin barrier. Previous studies in several populations have shown that loss-of-function mutations in the filaggrin gene (chromosome 1q21) are the most important genetic factor associated with predisposition to AD. **Objectives:** To evaluate the frequency of mutations in the genes that encode filaggrin (*FLG*) and filaggrin 2 (*FLG2*) in Brazilian patients with AD, as well as to study a possible relationship between the presence of a mutation and the severity of the condition and association with other allergic diseases. **Patients and Methods:** Presence of R501X and R2447X mutations in *FLG*, and S2377X and X2392S mutations in *FLG2* were investigated by PCR and Sanger sequencing in 115 AD patients. Total IgE and mite allergen-specific IgE to mite allergens Der p 1, Der p 2 (from *Dermatophagoides pteronyssinus*); Der f 1, Der f 2 (from *D. farinae*) and Blo t 5 (from *Blomia tropicalis*) levels were determined by ImmunoCAP and ImmunoCAP-ISAC, respectively. Disease severity was assessed by SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis index*). **Results:** Presence of a mutation in at least one of the studied genes (*FLG* e/ou *FLG2*) was found in 47 (40.9%) patients with AD. The R501X mutation in *FLG* was observed in 4 patients (3.4%), while R2447X mutation was not observed in any patient. The S2377X mutation in *FLG2* was identified in 45/115 (39.1%) patients and the X2392S mutation in one patient (heterozygous) who also presented the S2377X mutation. Age of patients and disease duration were higher in patients with *FLG* and/or *FLG2* mutations. Unexpectedly, disease severity given by SCORAD values was significantly higher among patients without mutations in the studied genes. **Conclusions:** In Brazilian patients with moderate to severe AD, the presence of the R501X mutation *FLG* was found in low frequency and did not show significant associations with clinical and demographic parameters. Patients who presented at least one mutation in the genes *FLG* and/or *FLG2* had a longer duration of the disease, however had lower values of SCORAD as compared to patients without these mutations.

**Key words:** Atopic dermatitis. Allergy. Filaggrin. Skin barrier. Mutation.

# ***Lista de Figuras***

*Lista de Figuras*

---

**Figura 1 - (A)** Histopatologia da pele mostrando hiperplasia e vesículas

---

espongióticas (**seta**) na epiderme e infiltrado de células inflamatórias constituído, principalmente, por linfócitos e alguns eosinófilos, na derme em lesão de DA ativa (HE x40); **(B)** Histopatologia das camadas epidérmica e dérmica da pele normal de um sujeito não atópico (HE x40); **(C)** Expressão da filagrina nas camadas córnea e granulosa na lesão de DA. (Imunohistoquímica com anticorpo anti-Filagrina x40); **(D)** Expressão de filagrina nas camadas córnea e granulosa em pele normal de um sujeito não atópico. (Imunohistoquímica com anticorpo anti-Filagrina x40); **(E)** Expressão da filagrina nas camadas córnea e granulosa na lesão de DA. (Imunohistoquímica com anticorpo anti-Filagrina x63); **(F)** Expressão de filagrina nas camadas córnea e granulosa em pele normal de um sujeito não atópico. (Imunohistoquímica com anticorpo anti-Filagrina x63) ..... 26

**Figura 2 - SCORAD** ..... 33

**Figura 3 -** Análise por eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados por PCR para a pesquisa de mutações nos genes *FLG* e *FLG2* ..... 38

**Figura 4 -** Análise de sequenciamento em paciente sem as mutações R501X e R2447X em *FLG* e S2392X em *FLG2*, e presença de mutação S2377X em *FLG2* ..... 40

**Figura 5 -** Análise de sequenciamento em paciente com as mutações R501X em *FLG* e S2377X em *FLG2* ..... 41

**Figura 6 -** Análise de sequenciamento em paciente com a mutação R501X em *FLG* e ausência da mutação S2377X em *FLG2* ..... 42

**Figura 7 -** Análise de sequenciamento em paciente com a mutação S2377X em *FLG2* (homozigoto), e mutação em S2392X ..... 43

## ***Lista de Tabelas***

*Lista de Tabelas*

**Tabela 1** - *Primers* utilizados em PCR para amplificação de DNA e

---

sequenciamento, para investigação de mutações nos genes *FLG*

---

e *FLG2* ..... 35

**Tabela 2 -** Condições de PCR: reagentes e volumes ..... 36

**Tabela 3 -** Mutações identificadas nos genes *FLG* e *FLG2*, presentes em 47 (40,9%) pacientes com dermatite atópica ..... 39

**Tabela 4 -** Características clínicas e demográficas dos pacientes com dermatite atópica estudados ..... 44

**Tabela 5 -** Características clínicas e imunológicas de pacientes com dermatite atópica, com presença e ausência da mutação R501X em *FLG* ..... 45

**Tabela 6 -** Características clínicas e imunológicas de pacientes com dermatite atópica, com presença e ausência da mutação S2377X em *FLG2* ..... 45

# ***Lista de Símbolos e Abreviaturas***

*Lista de Símbolos e Abreviaturas*

---

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>Blo t5-</b>                 | <i>Blomia tropicalis</i>  |
| <b>CTACK-</b>                  | <i>Cutaneous T cell-attracting chemokine</i>  |
| <b>DA-</b>                     | Dermatite atópica   |
| <b>DAB-</b>                    | <i>Diaminobenzidine tetra-hydrochloride</i>   |
| <b>Der f 1-</b>                | Alérgeno Der f 1 de <i>Dermatophagoides farinae</i>   |
| <b>Der p 1-</b>                | Alérgeno Der p 1 de <i>Dermatophagoides pteroyssinus</i>                                      |
| <b>HCFMRP-USP-</b>             | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| <b>IL-</b>                     | Interleucina (s)  |
| <b>ISU-</b>                    | <i>ISAC Standardized Units</i>  |
| <b>S. aureus-</b>              | <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| <b>SCORAD-</b>                 | <i>Scoring Atopic Dermatitis</i>  |
| <b>TARC-</b>                   | <i>Thymus and activation-regulated chemokine</i>  |
| <b>TCLE-</b>                   | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  |
| <b>TEWL-</b>                   | <i>Transepidermal water loss</i> (Perda transepidérmica de água)                              |
| <b>TNF<math>\alpha</math>-</b> | <i>Tumor necrosis fator alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)                             |



# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>18</b> |
| 1.1. Dermatite atópica: prevalência, manifestações clínicas e fisiopatologia .....  | 19        |
| 1.2. Associação da dermatite atópica com mutações no gene da filagrina .....  | 21        |
| 1.3. Estudos prévios de expressão de filagrina em biópsias de pele de pacientes com dermatite atópica por imuno-histoquímica .....                    | 24        |
| 1.4. Justificativa.....   | 26        |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>29</b> |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 29        |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 29        |
| <b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b> .....   | <b>30</b> |
| 3.1. Desenho do estudo e aspectos éticos .....  | 31        |
| 3.2. Critérios de inclusão.....   | 31        |
| 3.3. Critérios exclusão.....  | 31        |
| 3.4. Métodos de avaliação .....   | 31        |
| 3.4.1. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata .....   | 33        |
| 3.4.2. Determinação de IgE total e específica .....   | 34        |
| 3.4.3. Detecção de mutações no gene da filagrina.....   | 34        |
| 3.4.3.1. Obtenção do DNA .....  | 34        |
| 3.4.4. Sequenciamento por método de Sanger .....  | 34        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | <b>37</b> |
| 4.1. Amplificação do DNA para sequenciamento.....   | 38        |
| 4.2. Identificação de mutações nos genes <i>FLG</i> e <i>FLG2</i> em pacientes com dermatite atópica.....   | 38        |
| 4.3. Associação de mutações nos genes <i>FLG</i> e <i>FLG2</i> com características clínicas e imunológicas nos pacientes participantes do estudo..... | 43        |
| <br>  |           |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>46</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....  | <b>51</b> |
| <br>  |           |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>53</b> |



**1.1 Dermatite atópica: prevalência, manifestações clínicas e fisiopatologia**

A dermatite atópica (DA) é uma dermatose inflamatória crônica comum, com prevalência variável na população mundial, variando de 1% a 20%. Prevalências acima de 15% foram encontradas nos centros urbanos da África, Austrália e no norte e oeste da Europa (Shaw et al., 2011). Valores menores que 5% foram registrados na China, no Leste Europeu e na Ásia Central. Nos EUA e no Reino Unido observou-se prevalência de DA ao redor de 11% e 25% (Shamssain, 2007). No Brasil, o estudo multicêntrico ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*, 2008) demonstrou prevalência média de DA de 7,3% na faixa etária de seis e sete anos de idade e de aproximadamente 14% em adolescentes entre 13 e 14 anos (Ständer, 2021).

A DA, comumente, tem início na infância, em geral nos primeiros cinco anos de vida, e é frequentemente associada à alergia alimentar, asma e rinite; podendo, muitas vezes, preceder essas condições clínicas (Mischke et al., 1996; Arehart et al., 2022). Pode acarretar grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares (Coghi et al., 2007; Kupfer et al., 2010; Tejada et al., 2011; Amaral; March; Sant'Anna, 2012). As manifestações clínicas da doença são variadas e caracterizadas, principalmente, por xerose, liquenificação, descamação, escoriações, exsudação e prurido intenso. A DA é frequentemente associada a infecções bacterianas e virais (Palmer et al., 2006; Ewald et al., 2017). A forma no lactente, entre dois meses e dois anos de vida, inicia-se precocemente e as lesões cutâneas ocorrem predominantemente na face, no pescoço e couro cabeludo, enquanto a forma infantil, entre dois e 12 anos, tem predileção para dobras flexurais (antecubital e poplítea) e extremidades (Staab et al., 2006; Thyssen et al., 2013; Vardar Acar et al., 2020). Sua etiologia é multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais que atuam em conjunto na determinação da dermatite. Anormalidades na barreira cutânea, levando a alterações de sua função, associadas a desequilíbrio imunológico desencadeado pelo padrão de resposta Th2, caracterizado por aumento de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, estimulação de linfócitos B e produção de IgE, são considerados fatores importantes no desenvolvimento e na gravidade da doença (Kim; Leung, 2012; Moreno et al., 2016). Um paradigma clássico Th1/Th2 foi

previamente descrito na DA, com aumento dos níveis séricos de IgE em 80% dos pacientes, padrão de liberação de citocinas bifásica com predomínio de células Th expressando IL-4 e IL-13 (citocinas Th2) durante a fase aguda e perfil Th1 dominante na fase crônica (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) (Weisshaar et al., 2008; Batista et al., 2015).

Variantes genéticas têm sido associadas à DA, no entanto a presença de mutação no gene que codifica a filagrina (*filaggrin*, *filamento aggregating protein*) (*FLG*) atualmente se destaca como um fator de predisposição, gravidade e surgimento de comorbidades na DA (Cork et al., 2009; Hoyer et al., 2022). Em particular, mutações com perda de função R501X e 2282del4 no gene *FLG* foram associadas à DA. Até 60% dos europeus afetados com DA apresentam algum tipo de mutação em *FLG* (Elias; Schmuth, 2009; Cabanillas; Novak, 2016). Encontrar expressão diminuída de *FLG* pode resultar em escassez de grânulos de queratohialina (Cork et al., 2009; Paller; Kabashima K, Bieber, 2017).

A *FLG* é uma importante proteína estrutural, responsável pela queratinização, hidratação e funções antimicrobianas do estrato córneo da pele (Hertz et al., 2020; Masataka et al., 2021). É necessária para a geração do fator hidratante natural, que é produzido após a deaminação e degradação da *FLG*. O fator hidratante natural é importante para a manutenção da hidratação do estrato córneo e também reduz seu pH para cerca de 5,5. A insuficiência epidérmica de *FLG* aumenta a perda de água transepidérmica, causando ressecamento e rachaduras da epiderme. A insuficiência de *FLG* também leva à diferenciação aberrante de queratinócitos, resultando em conteúdo lipídico inadequado da pele. A insuficiência da barreira epidérmica resulta na penetração de alérgenos e microorganismos (Batista et al., 2015; Ewald et al., 2017).

Há fortes evidências de que mutações com perda de função no gene da *FLG* localizado no braço longo do cromossomo 21 (1q21) (Palmer et al., 2006; Asai et al., 2013) estão associadas com susceptibilidade à DA (Rodríguez et al., 2009, Michaels; Chandrasekaran; Shaw, 1975). A *FLG* é uma proteína estrutural na epiderme, cuja presença é fundamental para manter as funções de barreira cutânea, como proteção à penetração de alérgenos e micro-organismos, bem como a manutenção da permeabilidade, evitando a perda transepidérmica de água e íons, logo com função importante nos mecanismos fisiopatológicos da DA (Margolis, 2022).

Vários mediadores do prurido e seus receptores correspondentes são relatados como responsáveis pelo prurido na DA, incluindo histamina e seus receptores H1 e H4 (H1R e H4R) (Cowden et al., 2010; Mollanazar; Smith; Yosipovitch, 2016), certas proteases (incluindo triptase, ácaros e *Staphylococcus aureus* - *S. aureus*), IL-31, IL-4/13 e linfopietina estromal tímica (TSLP) (Bieber, 2008; Nakahara et al., 2021). O tratamento da doença é baseado em restaurar a hidratação cutânea (emolientes), amenizar o principal sintoma de prurido e controlar o processo inflamatório, bem como fornecer orientações ambientais/alimentares ao paciente e realizar o tratamento das infecções secundárias, quando necessário (Langan; Irvine; Weidinger, 2020).

## **1.2 Associação da dermatite atópica com mutações no gene da filagrina**

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas para se entender os componentes genéticos da DA. Em análises genômicas amplas não é necessário conhecimento pré-existente da função dos genes, nem da biologia da característica em questão. Em contraste, a análise genética direcionada, como uma abordagem de gene candidato, é uma estratégia na qual determinados *loci* ou genes considerados de interesse para o fenótipo são selecionados para estudo. Cada uma dessas estratégias tem sido usada para fornecer informações sobre DA (Brown; Elias; Bradley, 2020).

A *FLG*, proteína altamente insolúvel, rica em histidina, foi identificada por Beverly Dale, em 1977 (Gao et al., 2009; Bieber, 2017). Seu gene está localizado no complexo de diferenciação epidérmica, região com aproximadamente 60 genes, no cromossomo 1q21 (de Jongh et al., 2008; Bieber et al., 2017). Distúrbios na sua expressão podem acarretar alterações na função de barreira cutânea, uma vez que quantidades insuficientes de *FLG* resultarão em menores quantidades de aminoácidos umectantes, o que levará à perda de água e xerose cutânea. Além disso, haverá elevação do pH do microambiente, com ativação de serina proteases (Ying et al., 2006; Bin; Leung, 2016). Inicialmente, foram identificadas duas mutações no gene da *FLG*: R501X e 2282del4, resultando em proteína não traduzida e perda de sua função, associadas à ictiose e DA (Ying et al., 2006; Zielgler; Artis, 2010). Essa associação foi observada em populações da Irlanda e Escócia e em estudo de metanálise (Baurechet et al., 2007). Demonstrou-se que pacientes que carregam mutação com perda de

função no gene da *FLG* apresentam maior gravidade da doença, maior incidência de infecções herpéticas, bem como maior associação com outras doenças alérgicas como asma, rinite e alergia alimentar (Cardilli, 2010; Brown et al., 2011; Werfel et al., 2016).

Apesar de a *FLG* não ser expressa no epitélio pulmonar (Czarnowicki; Krueger; Guttman-Yassky, 2017), tem-se observado que a função de barreira alterada poderia facilitar a penetração de antígenos, estimulando a produção de TSLP pelo queratinócito, atuando à distância no pulmão. Essa facilidade de penetração antigênica também explicaria a forte associação da mutação com alergia ao amendoim, conforme observado em estudos prévios (Sandilands et al., 2007; McAleer; Irvine, 2013; Brunner; Guttman-Yassky; Leung, 2017).

Estudos subsequentes em diferentes regiões do mundo como Estados Unidos e países da Ásia, incluindo Japão, China e Singapura, confirmaram de forma consistente a associação de mutações no gene da *FLG* e DA (Czarnowicki; Krueger; Guttman-Yassky, 2014). Entretanto, a prevalência de mutações no gene da *FLG* entre pacientes com DA é de 10% a 50%, variando entre diferentes populações (Mohiuddin et al., 2013), mesmo quando são avaliados subgrupos de pacientes com DA moderada a grave, essa prevalência é de 47,5% a 56,6% (Irvine; McLean; Leung, 2011). Em um grupo de 101 pacientes com DA grave encaminhados ao centro de referencia National Jewish Health em Denver, Estados Unidos, 48,5% apresentaram mutações no gene da *FLG* (Giardina et al., 2008). Em algumas populações, como a italiana (Margolis et al., 2014; Brunner; Guttman-Yassky; Leung, 2017), africana ou afro-americana, embora a prevalência de DA seja comparável à de países do norte da Europa ou dos Estados Unidos, há baixa frequência de mutações no gene da *FLG* (Sandilands et al., 2006; de Guzman Strong et al., 2010; Schimitt et al., 2017).

A filagrina 2 (*FLG2*), assim como a *FLG* apresenta expressão diminuída, tanto em pele lesionada como em pele intacta de pacientes com DA, sendo que em pele lesionada esta redução se mostra mais pronunciada (Palmer et al., 2006; Addor; Aoki, 2010). Estudos mostram que a *FLG2* e *FLG* podem funcionar como parte da defesa antimicrobiana cutânea, particularmente contra *S. aureus*, que é associado com exacerbações de DA (Lodén, 2003; Čepelak I, Dodig S, Pavić, 2019). Estudos anteriores não encontraram associação de mutação no gene *FLG2* em pacientes

européus. Entretanto, estudos usando exoma total demonstraram que as mutações em *FLG2* foram associadas à persistência da DA em pacientes afro-americanos (Palmer et al., 2006). São mutações que geram um *stop-gain* no exon 3 prejudicando a produção da *FLG* (Liang; Chang; Lu, 2016). Dada a influência de afrodescendentes na composição da população brasileira, é possível que mutações em *FLG2* tenham relevância em pacientes com DA.

A presença de mutações no gene *FLG* tem sido identificada como importante biomarcador para gravidade da DA. Em estudo recente, 17 biomarcadores de DA foram examinados em *tape strips* e biópsias de pele coletadas de 25 crianças de descendência europeia com DA. Em locais de lesão, biópsias de pele mostraram típico perfil de resposta Th2, enquanto que em *tape strips* houve expressão elevada de TARC (*thymus and activation-regulated chemokine*) e de marcadores inflamatórios de imunidade inata, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa). Crianças foram genotipadas para as mutações em *FLG* comuns na população do norte da Europa (R501X, 2282del4 e R2447X), e 8/25 crianças apresentaram pelo menos uma mutação em *FLG*. Aquelas com mutações em *FLG* apresentaram níveis elevados de marcadores Th2 como TARC, CTACK (*cutaneous T cell-attracting chemokine*) e IL-13 em *tape strips*, quando comparadas a crianças sem mutação em *FLG* (Andersson et al., 2022).

Uma revisão sistemática recente da literatura incluindo 56 estudos investigou biomarcadores que pudessem prever o desenvolvimento de comorbidades atópicas em pacientes com DA. De forma interessante, a combinação de presença de mutações no gene *FLG* e de IgE específica elevada para alimentos e/ou aeroalérgenos foi associada de forma significativa com o desenvolvimento de asma em algumas coortes de início da vida, embora os estudos tenham sido considerados muito heterogêneos para permitirem conclusões definitivas (Broderick et al., 2022).

Um estudo recente avaliando 1836 crianças prospectivamente aos três, seis e 12 meses de vida, revelou prevalência de pelo menos uma das mutações no gene *FLG* (R501X, 2282del4, R2447X) de 9%. Mutações em *FLG* não foram associadas a defeito na barreira cutânea, medido por aumento da perda transepidermica de água (TEWL), aos três meses, mas aumentaram o risco de eczema aos três, seis e 12 meses de idade, e de DA aos seis e 12 meses de idade (Hoyer et al., 2022). Esta

aparente discrepância pode ser devida a vários fatores: TEWL não ser um bom marcador como fator causal para DA, mas sim para a gravidade da doença; foco em apenas três variantes pode ter deixado de identificar outras variantes importantes; a insuficiência de *FLG* pode ser causada, tanto geneticamente como por mecanismos imunes, particularmente pela ação de citocinas Th2 aumentadas (Grillo et al., 2006; Margolis, 2022).

### **1.3 Estudos prévios de expressão de filagrina em biópsias de pele de pacientes com dermatite atópica por imuno-histoquímica**

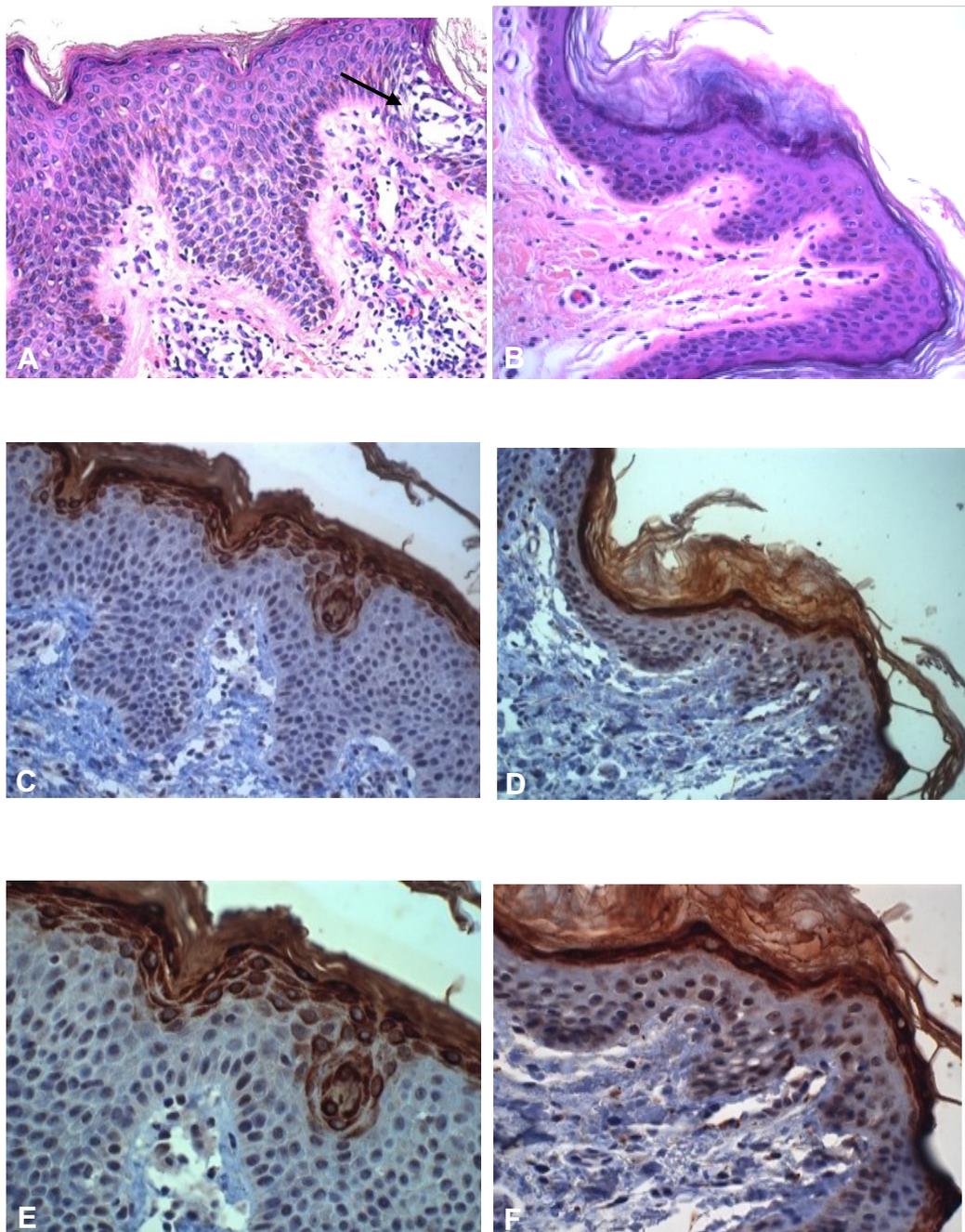
Vinte pacientes adultos, com DA, maiores de 18 anos que, posteriormente, foram incluídos no presente estudo, submeteram-se à biópsia de pele para análise da expressão da *FLG* por imuno-histoquímica. Essa etapa do estudo foi conduzida em colaboração com a Dra. Renata Nahas Cardili, médica assistente do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), que realizou as biópsias de pele como parte de seu projeto de pós-doutorado. O controle desses experimentos foi constituído de amostras de pele de pacientes sem DA, não alérgicos, submetidos a procedimentos cirúrgicos com finalidade estética, como abdominoplastia ou mamoplastia reducionais, atendidos nos Ambulatórios de Cirurgia Plástica do HCFMRP-USP. Esses pacientes foram convidados a participar do estudo com a doação de amostra de pele normal, medindo aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, para servir de controle aos experimentos de imuno-histoquímica, mediante concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sem risco ou desconforto adicionais, pois o material foi constituído por excesso de pele normal já ressecada, após o procedimento cirúrgico estético realizado.

Amostras de pele de áreas com lesões ativas foram coletadas dos pacientes com DA, utilizando-se um punçador (punch 4 mm), após assepsia local e aplicação intradérmica de anestesia local com lidocaína 2%. Para os ensaios de imuno-histoquímica, foi utilizado anticorpo primário de camundongo anti-*FLG* (clone SPM 181, Abcam, Cambridge, MA), sendo a revelação realizada com DAB (diaminobenzidine tetra-hydrochloride) líquido (Kit Spring, Bioscience, CA, USA). Foram avaliados 20 pacientes com DA, com média de idade de 38 anos (19-64 anos),

64% do gênero feminino, com tempo médio de doença de 23,2 anos, média de SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*) de 46,5, e média geométrica de IgE total de 13.729 UI/mL (faixa de 145-63.000 UI/mL) que apresentaram pele com lesão ativa, sem ter sido suspenso tratamento da DA, e 20 indivíduos controle sem história clínica de doenças alérgicas, submetidos a cirurgia plástica eletiva, com média de idade de 60,1 anos (12-74 anos).

Os resultados mostraram que a epiderme e a derme apresentavam dermatite espongiforme em lesões de DA ativa e crônica, com acentuada hiperplasia epidérmica. A expressão de *FLG* foi forte e detectável em mais de 90% das células em todas as amostras de pele envolvidas de pacientes com DA (Figuras 1A, 1C, 1E), bem como na pele normal de controles não atópicos (Figuras 1B, 1D, 1F). Não foram observadas diferenças significantes na expressão da *FLG* em lesões ativas da pele de pacientes com DA em comparação com a pele normal de indivíduos não atópicos. As biópsias foram analisadas por patologista experiente, sem conhecer o grupo ao qual o indivíduo pertencia, se DA ou controle. Diluições adicionais do anticorpo monoclonal anti-*FLG* foram realizadas (1:500 e 1:1000), e os resultados foram consistentes, sem diferenças na presença e/ou intensidade da expressão de *FLG* na pele de pacientes e controles.

**Figura 1 - (A)** Histopatologia da pele mostrando hiperplasia e vesículas espongiformes (**seta**) na epiderme e infiltrado de células inflamatórias constituído, principalmente, por linfócitos e alguns eosinófilos, na derme em lesão de DA ativa (HE x40); **(B)** Histopatologia das camadas epidérmica e dérmica da pele normal de um sujeito não atópico (HE x40); **(C)** Expressão da filagrina nas camadas córnea e granulosa na lesão de DA. (Imuno-histoquímica com anticorpo anti-Filagrina x40); **(D)** Expressão de filagrina nas camadas córnea e granulosa em pele normal de um sujeito não atópico. (Imuno-histoquímica com anticorpo anti-Filagrina x40); **(E)** Expressão da filagrina nas camadas córnea e granulosa na lesão de DA. (Imuno-histoquímica com anticorpo anti-Filagrina x63); **(F)** Expressão de filagrina nas camadas córnea e granulosa em pele normal de um sujeito não atópico. (Imuno-histoquímica com anticorpo anti-Filagrina x63)



#### 1.4 Justificativa

Não foram encontrados, na literatura, estudos sobre identificação de mutações nos genes que codificam *FLG* ou *FLG2* em pacientes brasileiros com DA. A demonstração de mutações nos genes que codificam *FLG* ou *FLG2* em pacientes com DA pode levar a propostas terapêuticas promissoras, uma vez que drogas que influenciam o controle da expressão desses genes, ou estratégias que restauram a

sua expressão, recuperando a integridade da barreira cutânea, seriam de grande benefício aos pacientes e seus familiares.



---

## 2. Objetivos

---

### Objetivos

#### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de mutação nos genes que codificam *FLG* e *FLG2* em pacientes brasileiros com dermatite atópica.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar mutações nos genes que codificam *FLG* e *FLG2* em pacientes brasileiros com dermatite atópica.
- Avaliar possível associação de mutação nos genes *FLG* e *FLG2* com maior gravidade da doença, avaliada por SCORAD.
- Investigar possível associação de mutações nos genes *FLG* e *FLG2* com presença de sensibilização a aeroalérgenos.

### ***3. Pacientes e Métodos***

---

### **3.1 Desenho do estudo e aspectos éticos**

Foi realizado estudo epidemiológico descritivo observacional, avaliando-se 115 pacientes com idades entre cinco e 69 anos.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, Processo nº 7807/2013. A elaboração do TCLE foi baseada nas resoluções vigentes com as seguintes orientações: linguagem acessível, esclarecimentos do propósito do estudo e dos procedimentos necessários, e resguardo da privacidade, bem como dos dados confidenciais do paciente. Aos participantes foi assegurada a liberdade de opção da não inclusão no estudo, sem prejuízo, atraso ou interferência no seu seguimento, escolha ou realização do tratamento da sua doença. Os participantes selecionados para o estudo foram previamente informados sobre os objetivos gerais da investigação, procedimentos a serem realizados, métodos de obtenção das amostras, seus riscos e benefícios e receberam cópia do TCLE.

### **3.2 Critérios de inclusão**

Foram incluídos no presente estudo pacientes com diagnóstico de DA, sem distinção de sexo, raça ou grupo social, selecionados entre aqueles atendidos nos Ambulatórios de Alergia e Imunologia e de Dermatologia Geral do HCFMRP-USP, que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE.

### **3.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídos pacientes que não concordaram em participar do estudo, gestantes ou puérperas, pacientes com imunodeficiências primárias ou secundárias, ou com outras doenças cutâneas.

### **3.4 Métodos de avaliação**

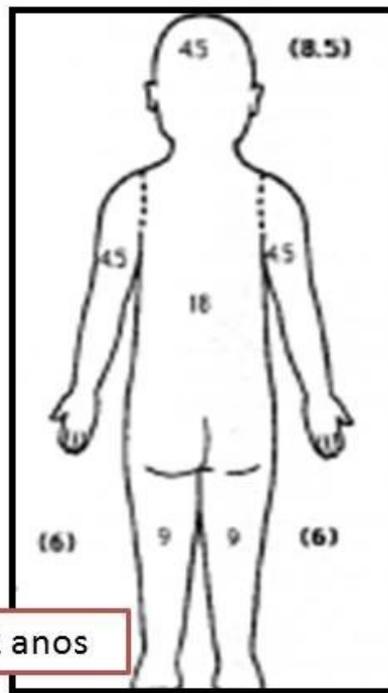
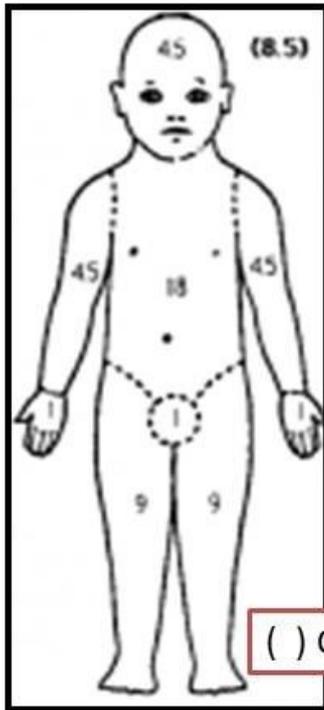
Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, dosagem de IgE total, a testes cutâneos de hipersensibilidade imediata e/ou medida de IgE específica para painel de alérgenos relevantes e estudo genético para pesquisa de mutações nos genes *FLG* e *FLG2*.

O diagnóstico de DA foi estabelecido usando os critérios de Hanifin e Rajka (Stalder et al., 1993; Boguniewicz et al., 2017; Heede et al. 2017). A gravidade da DA na ocasião da inclusão no estudo foi determinada pelo SCORAD (Figura 2), índice baseado em sinais e sintomas clínicos de acordo com: extensão de comprometimento cutâneo (pontuação de 0 a 100%), intensidade do eritema, edema, exsudação/crostas, escoriações, liquenificação e xerose (pontuação de 0-3), além de sintomas subjetivos como qualidade do sono e intensidade do prurido (pontuação 0-10) (Stalder et al., 1993). A classificação da gravidade foi de leve (SCORAD <25), moderada (SCORAD entre 25 e 50) e grave (SCORAD >50) (Simpson et al., 2017).

**Figura 2 - SCORAD**

**SCORAD**  
EUROPEAN TASK FORCE  
ON ATOPIC DERMATITIS

Instituição  
Nome:  
Data Nasc:  
Data consulta:



( ) Crianças < 2 anos

1. Extensão: (0-100): \_\_\_\_ (A)

2. Intensidade (B):

- 0- ausente
- 1-leve
- 2-moderada
- 3-grave

- Eritema \_\_\_\_
- Edema/pápulas \_\_\_\_
- Exsudação/crostas \_\_\_\_
- Escoriação \_\_\_\_
- Liquenificação \_\_\_\_
- Xerose (pele sem lesões) \_\_\_\_
- SOMA: \_\_\_\_

3. Sintomas subjetivos (C):

- Perda de sono 0-10: \_\_\_\_
- Prurido 0-10: \_\_\_\_  
(últimos 3 dias)

**SCORAD INDEX**  
 $A/5 + 7 B/2 + C = \underline{\hspace{2cm}}$

3.4.1 Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata

Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata (testes de puntura, *Prick tests*) foram realizados na face ventral do antebraço, usando uma lanceta (Allergopricks Inox, Flexor, SP, Brasil). A reação foi considerada positiva se ocorresse a formação de uma pápula maior ou igual a 4 mm, acompanhada por eritema, após 15 minutos da aplicação do alérgeno. Controles positivo (dihidroclorato de histamina 10mg/ml) e negativo (soro fisiológico 0,9%) foram aplicados em todos os testes.

### **3.4.2 Determinação de IgE total e específica**

Níveis séricos de IgE total foram determinados usando o sistema ImmunoCAP (Thermo Fisher, Brasil) e os resultados expressos em UI/mL. Níveis de IgE para alérgenos específicos foram determinados por método de microarray, utilizando o ImmunoCAP-ISAC, sendo os resultados expressos em ISU (Isac Standardized Units). Foram seguidas as recomendações do fabricante para a realização de ambos os ensaios.

### **3.4.3 Detecção de mutações no gene da filagrina**

#### **3.4.3.1 Obtenção do DNA**

Foi realizada extração de DNA genômico a partir de 2,0 mL de sangue venoso utilizando-se o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O DNA genômico foi quantificado no equipamento NanoVue (GE, Chicago, Illinois, EUA) e, posteriormente, diluído para concentração de 100 ng/uL para uso nas reações de PCR.

#### **3.4.4 Sequenciamento por método de Sanger**

Foi realizado teste de PCR (proteína C reativa) com amplificação de 1,0 uL de DNA genômico na concentração de 100 ng/uL. Foram utilizados *primers* na concentração de 10 uM (IDT, Coralville, Iowa, EUA), com sequências apresentadas na

Tabela 1. A amplificação do DNA foi realizada com Platinum™ Taq DNA Polymerase e dNTP Set (100 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), com etapas de desnaturação a 94°C por oito minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por dois minutos; extensão a 72°C por cinco minutos e manutenção a 4°C. Os reagentes e seus volumes para cada reação de PCR estão apresentados na Tabela 2.

O produto de PCR foi purificado utilizando o ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O equipamento utilizado para reação de PCR, purificação de DNA e reação de sequenciamento foi o termociclador Master cycle pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O sequenciamento foi realizado no sequenciador Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Foster City, Califórnia, EUA).

**Tabela 1** - *Primers* utilizados em PCR para amplificação e sequenciamento de DNA, para investigação de mutações nos genes *FLG* e *FLG2*

| Gene        | Mutação         | Primers   | Tamanho do fragmento |
|-------------|-----------------|---|----------------------|
| <i>FLG</i>  | R501X           | F: 5' GCGCGGGCAAGCTTCATC 3'<br>R: 5' GAGTGCCTGGTGCCGTCTCC 3'            | 549 bp               |
| <i>FLG</i>  | R2447X          | F: 5' CAAGTGCAGGAGAGACACGGAT 3'<br>R: 5' CTGGCCCACCTGCGAGTGTCC 3'       | 683 bp               |
| <i>FLG2</i> | S2377X e S2392X | F: 5' CAA AGG CAT GGA TCA AGT CAG3'<br>R: 5' GAG ACT GAT ACT GAG AAT de | 295 bp               |

**Tabela 2** - Condições de PCR: reagentes e volumes

|               | R501X  | R2447X | S2377X/S2392X |
|---------------|--------|--------|---------------|
| Reação de PCR | 549 pb | 683 pb | 295 pb        |
|               | V (uL) | V (uL) | V (uL)        |

---

|                                       |           |           |           |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Água Ulltrapura                       | 18,75     | 18,80     | 17,30     |
| 10X PCR Buffer (kit Platinum)         | 2,50      | 2,50      | 2,50      |
| MgCl <sub>2</sub> 50mM (kit Platinum) | 0,55      | 0,50      | 2,00      |
| dNTP 5mM                              | 1,00      | 1,00      | 1,00      |
| <i>Primer F</i> 1:10 (10uM)           | 0,50      | 0,50      | 0,50      |
| <i>Primer R</i> 1:10 (10uM)           | 0,50      | 0,50      | 0,50      |
| DNA polimerase (kit Platinum)         | 0,20      | 0,20      | 0,20      |
| <b>TOTAL</b>                          | <b>24</b> | <b>24</b> | <b>24</b> |

---

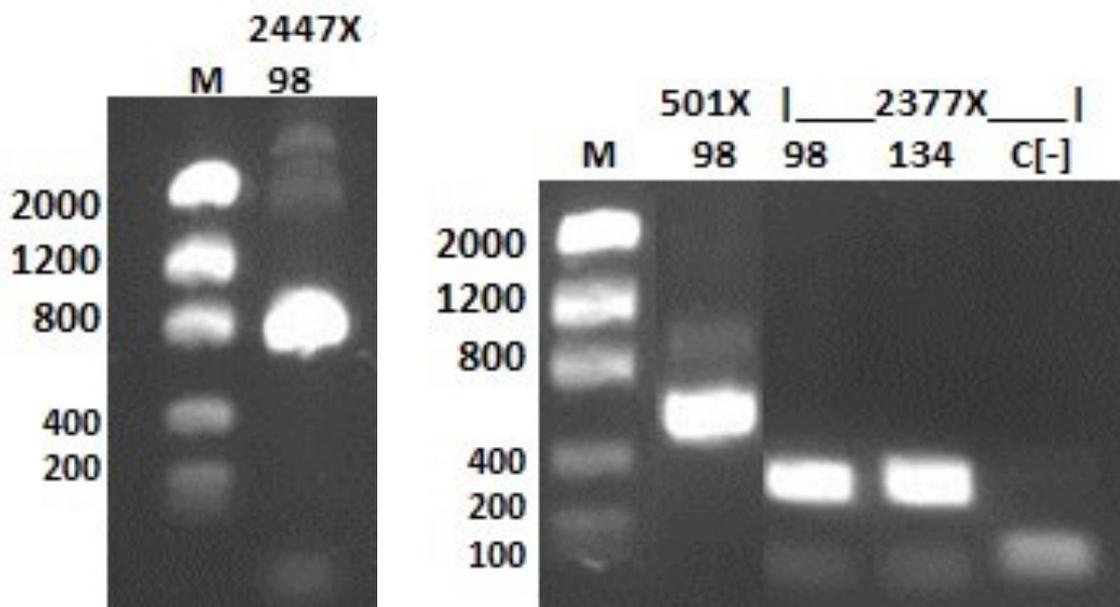
## ***4. Resultados***

---

#### 4.1 Amplificação do DNA para sequenciamento

A Figura 3 mostra a análise de fragmentos amplificados dos genes *FLG* e *FLG2* para sequenciamento, com o objetivo de identificar mutações R501X, R2447X; e S2377X e S2392X.

**Figura 3** - Análise por eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados por PCR para a pesquisa de mutações nos genes *FLG* e *FLG2*



#### 4.2 Identificação de mutações nos genes *FLG* e *FLG2* em pacientes com dermatite atópica

A mutação R501X no gene *FLG* foi observada em quatro pacientes (3,4%), enquanto que a R2447X não foi encontrada em nenhum paciente. A mutação S2377X no gene *FLG2* foi identificada em 45 pacientes (39,1%) e a X2392S em um paciente que também apresentou mutação S2377X (Tabela 3). Dois pacientes apresentaram ambas as mutações R501X e S2377X.

**Tabela 3** - Mutações identificadas nos genes *FLG* e *FLG2*, presentes em 47 (40,9%) pacientes com dermatite atópica

| Mutações             | n = 115 pacientes (%) |
|----------------------|-----------------------|
| R501X em <i>FLG</i>  | 4 (3,4%)              |
| R2447X em <i>FLG</i> | 0 (0%)                |

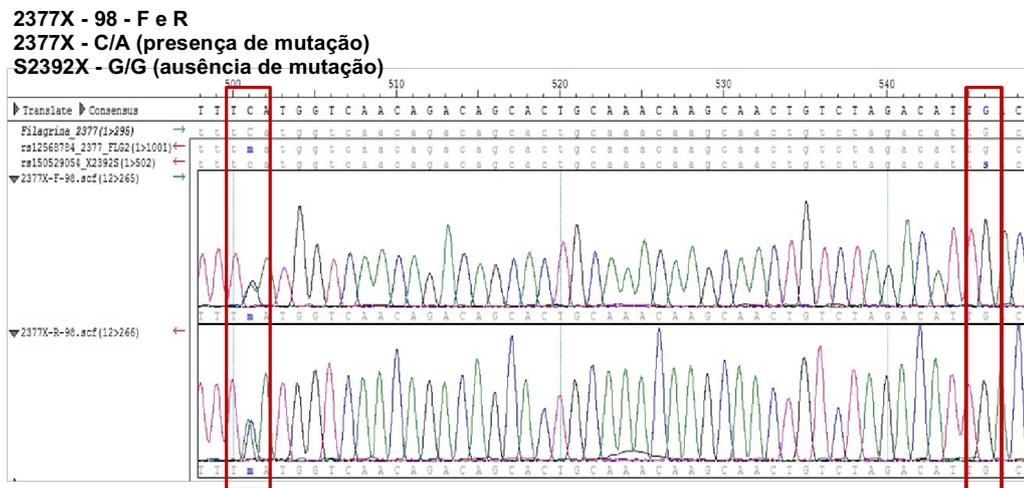
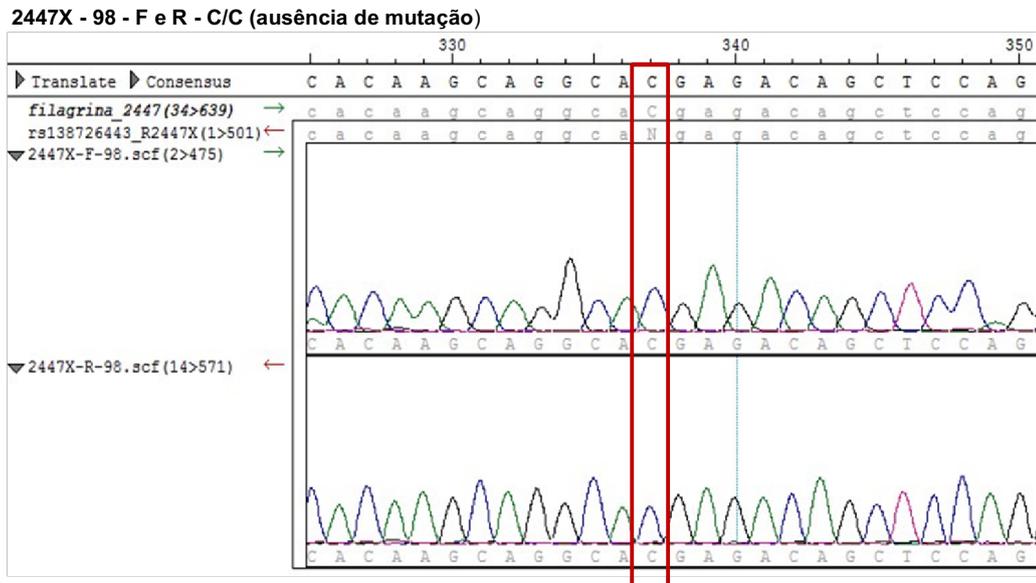
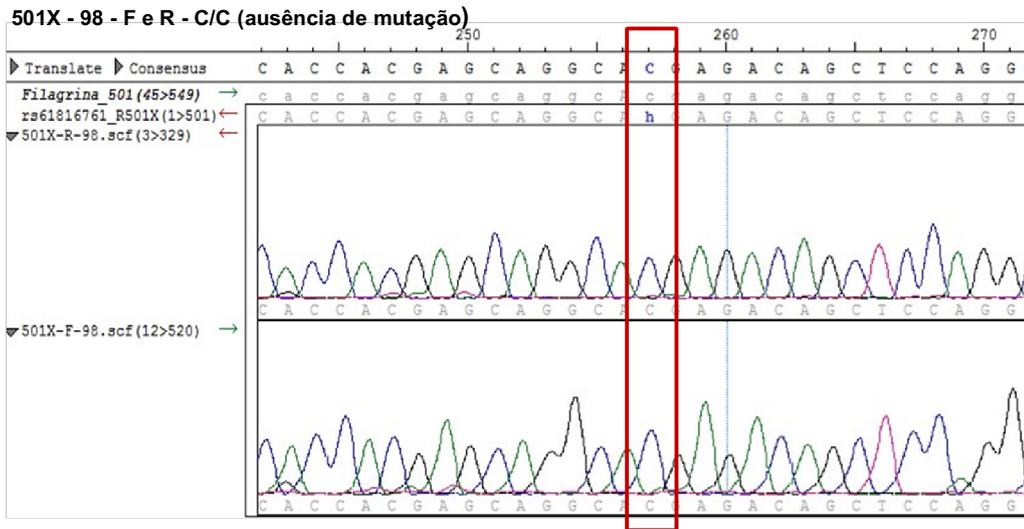
---

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| S2377X em <i>FLG2</i> | 45 (39,1%) |
| S2392X em <i>FLG2</i> | 1 (0,87%)  |
| Sem mutação           | 68 (59,1%) |

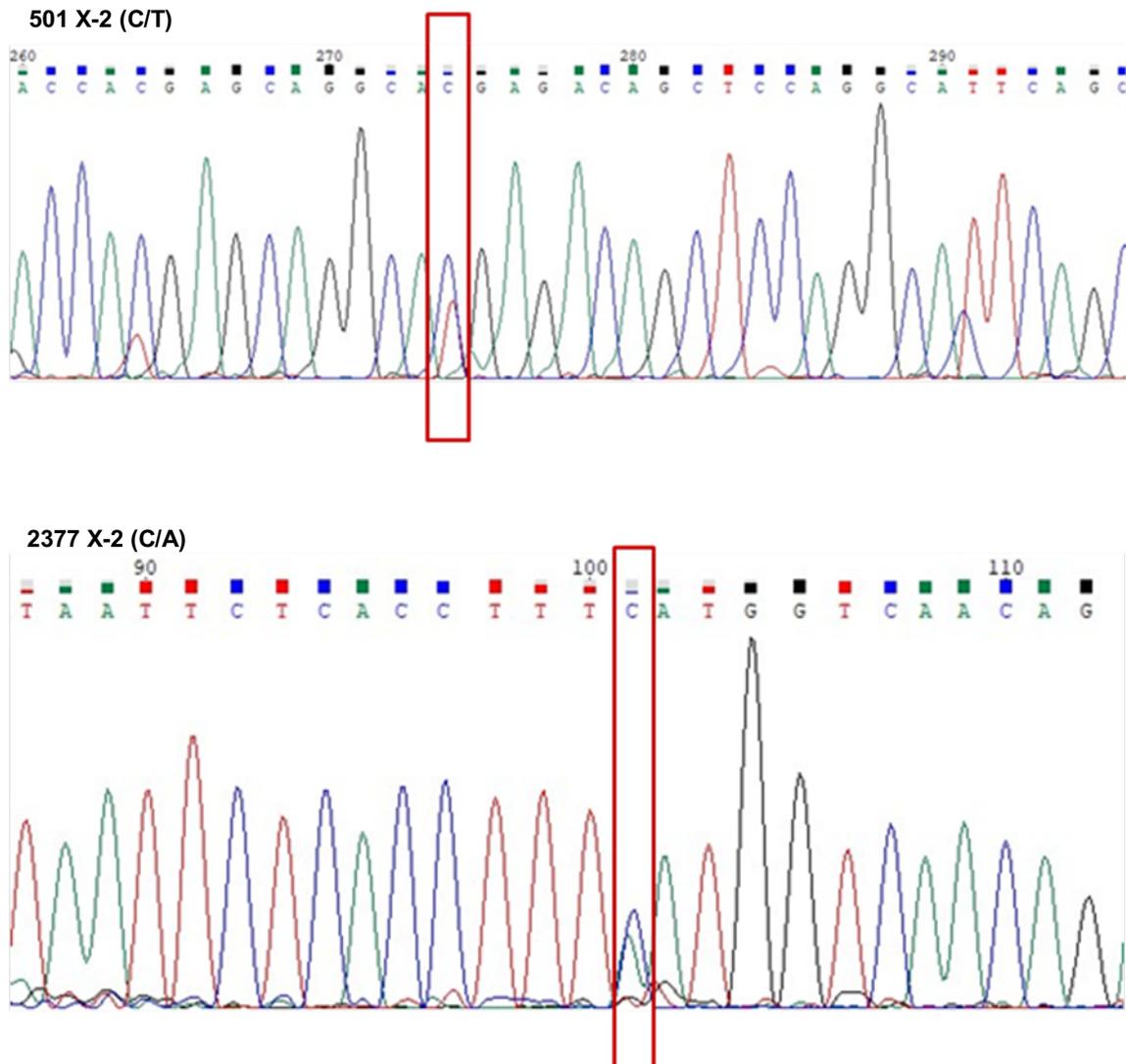
---

As Figuras 4 a 7 mostram resultados de sequenciamento em pacientes representativos com mutações nos genes *FLG* e *FLG2*.

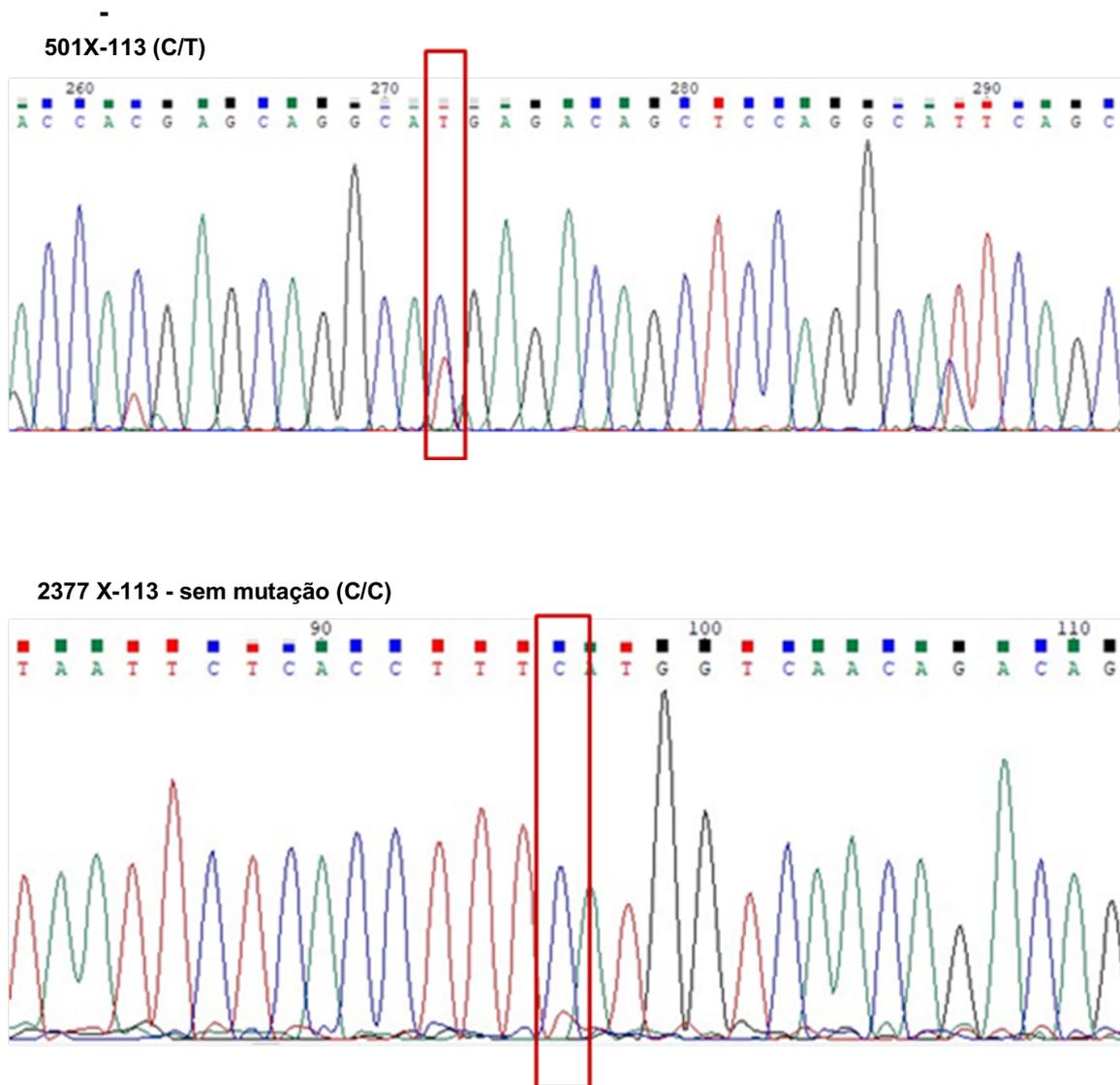
**Figura 4 - Análise de sequenciamento em paciente sem as mutações R501X e R2447X em *FLG* e S2392X em *FLG2*, e presença de mutação S2377X em *FLG2***



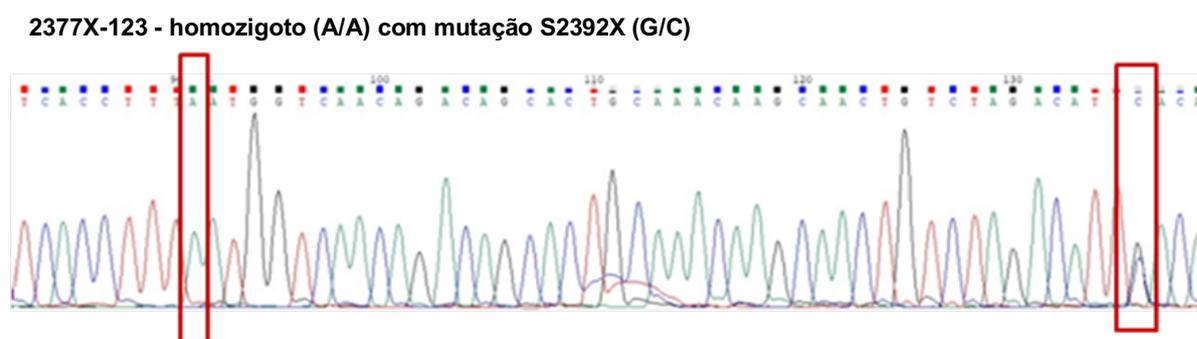
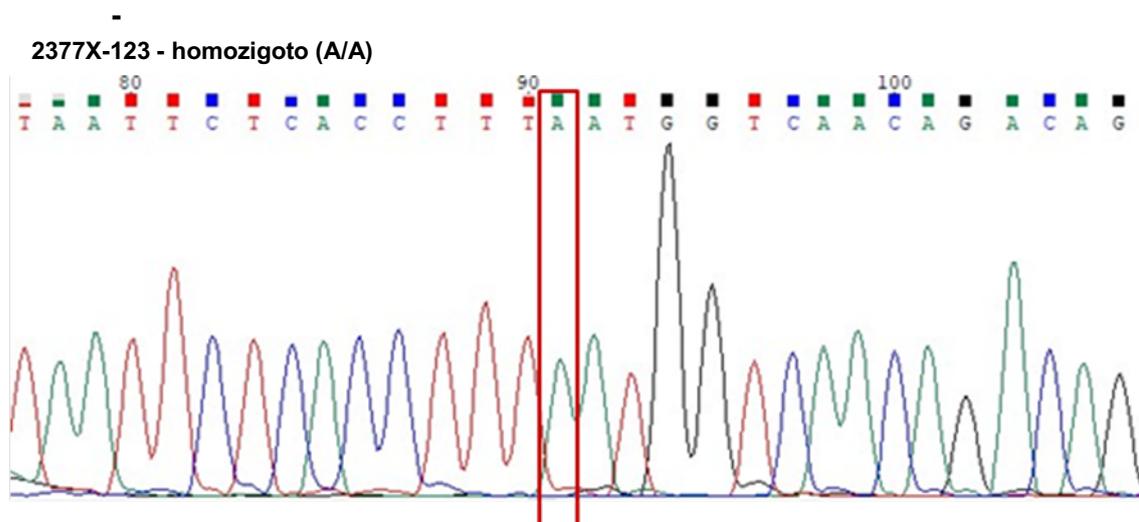
**Figura 5** Análise de sequenciamento em paciente com as mutações R501X em *FLG* e S2377X em *FLG2*



**Figura 6** Análise de sequenciamento em paciente com a mutação R501X em *FLG* e ausência da mutação S2377X em *FLG2*



**Figura 7** Análise de sequenciamento em paciente com a mutação S2377X em *FLG2* (homozigoto), e mutação em S2392X



#### 4.3 Associação de mutações nos genes *FLG* e *FLG2* com características clínicas e imunológicas nos pacientes participantes do estudo

Dentre os 115 pacientes estudados, 47 (40,9%) apresentaram mutação nos genes *FLG* ou *FLG2*. Desses 47, 37 eram do gênero feminino e 10 do gênero masculino. A média de idade dos pacientes com mutação foi de 30,2 anos, e significativamente mais elevada do que naqueles que não apresentaram mutação ( $p=0,03$ ). O tempo da doença teve média de 20,7 anos nos pacientes identificados com alguma mutação e de 15,3 anos naqueles sem mutação, sendo esta diferença significativa ( $p=0,03$ ). O SCORAD apresentou média de 39,9 em pacientes com mutação e de 47,7 nos sem mutação, sendo esta diferença significativa ( $p=0,02$ ) (Tabela 4).

Não foram observadas diferenças significantes em relação a: idade no início dos sintomas (mediana 5 e 4 anos); duração da doença (média de 20,7 e 15,3 anos); IgE total (mediana 2.299 e 2.260 UI/mL); IgE para Der p 1 (mediana 34,4 e 40 ISU) e Der p 2 (mediana 50,3 e 50,7 ISU) entre pacientes com a mutação R501X no gene *FLG* e/ou com a mutação S2377X em *FLG2*, quando comparados àqueles sem essas mutações, respectivamente.

A análise das características dos pacientes que apresentaram a mutação R501X em *FLG* e a mutação S2377X em *FLG2*, quando comparados a pacientes sem estas mutações, está apresentada nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 4** - Características clínicas e demográficas dos pacientes com dermatite atópica estudados

| Parâmetro   | Presença de mutações R501X e/ou S2377X (n=47) | Ausência de mutações R501X e/ou S2377X (n=68) | Valor de p  |
|---|---|---|-------------|
| Idade, média em anos (faixa)                        | 30,2 (7 a 69)                                 | 24,9 (5 a 66)                                 | <b>0,03</b> |
| Idade do início dos sintomas, média em anos (faixa) | 9,4 (0 a 51)                                  | 9,5 (0 a 49)                                  | 0,82        |
| Tempo de doença, em anos (faixa)                    | 20,7 (5 a 64)                                 | 15,3 (2 a 55)                                 | <b>0,03</b> |
| SCORAD (faixa)                                      | 39,9 (2 a 90)                                 | 47,7 (3,2 a 97)                               | <b>0,02</b> |

**Tabela 5** - Características clínicas e imunológicas de pacientes com dermatite atópica, com presença e ausência da mutação R501X em *FLG*

| Parâmetros (média)                                  | Presença de mutação R501X (n=4) | Ausência de mutação R501X (n=111) | Valor de p |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|------------|
| Idade em anos, média (faixa)                        | 25 (14 a 36)                    | 27,1 (5 a 69)                     | 0,94       |
| Idade do início dos sintomas, média em anos (faixa) | 0,9 (0 a 3)                     | 9,8 (0 a 51)                      | 0,06       |
| Tempo de doença, média em anos (faixa)              | 24,0 (14 a 37,5)                | 17,3 (2 a 64)                     | 0,15       |
| SCORAD, faixa                                       | 52,8 (14 a 90)                  | 44,2 (12 a 87)                    | 0,75       |
| IgE total, mediana UI/mL (faixa)                    | 11140,0 (1280 a 31828)          | 2240,0 (7,7 a 63000)              | 0,14       |
| IgE para Der p 1, mediana ISU (faixa)               | 41,5 (15,6 a 60)                | 35,7 (0,2 a 26,1)                 | 0,96       |

|                                       |                      |                    |      |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------|------|
| IgE para Der p 2, mediana ISU (faixa) | 125,4 (19,9 a 125,4) | 50,1 (0,7 a 150,6) | 0,57 |
| IgE para Der f 1, mediana ISU (faixa) | 42,6 (27,6 a 127,4)  | 28,7 (0,2 a 132,3) | 0,28 |
| IgE para Der f 2, mediana ISU (faixa) | 52,0 (14,7 a 124,6)  | 37,2 (0,3 a 134,6) | 0,6  |
| IgE para Blo t 5, mediana ISU (faixa) | 7,0 (0,9 a 39,8)     | 4,4 (0,1 a 132,4)  | 0,81 |

**Tabela 6** - Características clínicas e imunológicas de pacientes com dermatite atópica, com presença e ausência da mutação S2377X em *FLG2*

| Parâmetros (média)                           | Presença de mutação S2377X (n=45) | Ausência de mutação S2377X (n=70) | Valor de p  |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------|
| Idade (média)                                | 30,8 (7 a 69)                     | 24,7 (5 a 66)                     | <b>0,02</b> |
| Idade do início dos sintomas (média em anos) | 9,8 (0 a 51)                      | 9,2 (0 a 49)                      | 0,58        |
| Tempo de doença (média em anos)              | 20,9 (5 a 54)                     | 15,4 (2 a 55)                     | <b>0,03</b> |
| SCORAD                                       | 39,5 (2 a 90)                     | 47,7 (3,2 a 87)                   | <b>0,02</b> |
| IgE total (mediana em UI/mL)                 | 1804 (38,7 a 47040)               | 2823 (7,7 a 63000)                | 0,65        |
| Derp 1 (mediana ISU)                         | 34,4 (0,2 a 101,7)                | 40 (0,25 a 106,1)                 | 0,39        |
| Derp 2 (mediana ISU)                         | 50,3 (0,9 a 150,6)                | 50,7 (0,2 a 106,1)                | 0,87        |
| Derf 1 (mediana ISU)                         | 27 (0,2 a 127,4)                  | 38,2 (0,3 a 132,3)                | 0,53        |
| Derf 2 (mediana ISU)                         | 37,3 (0,3 a 134,6)                | 36,3 (0,6 a 129,7)                | 0,89        |
| Blot 5 (mediana ISU)                         | 5,2 (0,1 a 89,7)                  | 4,4 (0,2 a 132,4)                 | 0,99        |

## ***5. Discussão***

---

Na literatura atual é clara a consideração da deficiência de *FLG*, em particular causada por mutações no gene *FLG*, como um dos principais fatores de risco para DA, inclusive associada ao desenvolvimento da marcha atópica. A alteração da função de barreira cutânea associada à falta de *FLG* na DA é, juntamente com outros fatores patogênicos conhecidos, a base para a sensibilização alérgica a alérgenos alimentares e aeroalérgenos, e o conseqüente desenvolvimento de asma e rinite alérgica. Os ensaios laboratoriais, exames diagnósticos que auxiliam na elucidação clínica, atualmente usados na prática, se concentram, principalmente, no monitoramento de alterações imunes ou inflamatórias (por exemplo, IgE total e específica) e menos no controle do comprometimento da função de barreira da pele, incluindo deficiência de *FLG*. No presente estudo esses parâmetros laboratoriais não apresentaram valores estatisticamente significativos comparando os pacientes com e sem a doença.

Em estudos iniciais, como citado por Vardar Acar et al. (2020), a associação das alterações do *FLG* com as doenças supracitadas foi inicialmente descrita em pacientes com ictiose vulgar por Smtih et al. (2006). Nesse estudo, as mutações de R501X e 2282del4 foram significativamente associadas à ictiose vulgar em famílias irlandesas, escocesas e europeias americanas. Nos anos seguintes, muitos estudos populacionais foram realizados mostrando a importância das mutações *FLG* em doenças atópicas, e as mutações específicas da população foram confirmadas por muitos estudos seguintes (Vardar Acar et al., 2020).

Diante disso, o presente estudo objetivou identificar mutações no gene da *FLG* em pacientes brasileiros com DA e relacionar as características clínicas e a gravidade da doença. A vantagem deste estudo foi a inclusão de pacientes com SCORAD caracterizando a doença em moderada ou grave, acompanhados em centro de referência para a doença. O diagnóstico de DA foi estabelecido usando os critérios de Hanifin e Rajka. Pacientes com doenças cutâneas que pudessem confundir o diagnóstico foram excluídos. Entretanto, a principal limitação deste estudo foi a necessidade de realizar também discriminação alélica devido a genes com alta taxa de repetição. A reação está em processo de validação por nosso grupo. Na última década, cerca de 60 mutações do gene *FLG* foram detectadas com frequência de 8 a

10% em diferentes populações ao redor do mundo, sendo as mutações mais comuns de *FLG* na população europeia.

De acordo com as informações disponíveis no navegador gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>) cerca de 300 variantes de *FLG* até o momento foram identificadas em vários estudos populacionais em pacientes atópicos. Estudos em pacientes com DA até agora encontraram 16 novas mutações no gene *FLG*, sugerindo que a *FLG* pode ter associação com distúrbios atópicos (Salama et al., 2021).

Os dados deste estudo contrapõem de forma geral os estudos da literatura, já que se costuma evidenciar a presença de mutações como fator de extrema relevância para a gravidade da doença. Algumas hipóteses que podem justificar esse fato é que em pacientes brasileiros existe a possibilidade de outro gene estar envolvido na fisiopatologia da DA. Assim como descrito por Nakahara et al. (2021), a deficiência de *FLG* causa DA em idade precoce, aumenta a sensibilidade e gravidade das alergias e aumenta a vulnerabilidade à infecção, no entanto 40% dos portadores da mutação *FLG* não desenvolvem DA, e as mutações *FLG* são encontradas apenas em 15-50% dos pacientes com DA. Assim, anormalidades genéticas no *FLG*, isoladamente, não explicariam todas as disfunções da barreira cutânea da DA.

Correlacionando a presença de mutações com a gravidade dos sintomas, já havia sido relatado anteriormente por Margolis et al. (2014) que os indivíduos com variantes *FLG* eram menos propensos a estarem livres de sintomas em comparação com aqueles sem essas variantes. Curiosamente, as crianças dessa coorte estudada, portadoras de uma variante, eram mais propensas a não responderem às terapias. Outro estudo interessante de Margolis (2022), investigando o efeito dessas variantes, apoia a noção de que o efeito delas é proeminente durante uma fase muito precoce da vida. Além disso, há autores que mostraram associação com maior duração e hospitalização mais frequente em coortes de portadores de variantes (Liang; Chang; Lu, 2016).

O fato de que a idade de início da doença está altamente correlacionada com a gravidade não foi um fator estatisticamente considerável nos resultados do presente estudo. Provavelmente, na presente amostra esse fator esteve mais relacionado à

disfunção da barreira cutânea como primária, corroborando com a hipótese de que a frequência de mutações importa e amplifica a gravidade, e o efeito é intensificado com o número de variantes causais.

Destaca-se também o fato de não terem sido avaliados controles sem DA; o que, possivelmente, possibilitaria a magnitude dos resultados ser ainda maior com tal conjunto de controles pareados e triados.

De acordo com Margolis et al. (2014), os polimorfismos do gene *FLG2* estão associados à persistência da DA em afro-americanos e estão ausentes ou raramente são encontrados em indivíduos de origem europeia. No presente estudo 39,1% dos pacientes apresentaram tal alteração corroborando com dados da literatura. Leva-se em conta que a população brasileira apresenta alto grau de miscigenação e segue padrões étnicos diferentes quando comparada a grupos populacionais de outros países e continentes como China, Estados Unidos, Japão e Europa, onde já existem estudos com a prevalência da *FLG*. Portanto, é difícil estabelecer uma classificação por etnias no Brasil. O uso exclusivo de informações da etnia autodeclarada não seria o melhor método de classificação étnica.

Segundo Dvornyk et al. (2021), deve haver associação do gene *FLG* com DA predominantemente em mulheres, mas há um número limitado de estudos demonstrando diferenças relacionadas ao gênero nas associações de candidatos, inclusive no presente estudo, apesar de o número de pacientes do gênero feminino que apresentaram a mutação ser maior que o do gênero masculino, esse fator não foi estatisticamente avaliado.

Uma compreensão completa da complexa patogênese da DA é necessária para se descobrirem biomarcadores específicos e alvos terapêuticos. Em relação aos potenciais avanços na terapia da DA, estudos com anti-inflamatórios tópicos mostraram que a inflamação, principalmente por meio de citocinas Th2, reduz a expressão da *FLG* (Batista et al., 2015). Há relatos demonstrando que a IL-17A desregula a expressão da *FLG* e genes importantes para adesão celular, o que poderia afetar a formação da barreira epidérmica (Smieszek et al., 2020). Portanto, intervenções visando resposta imune defeituosa, regulação positiva da expressão da

*FLG*, ou processo de tradução de proteínas terão impacto significativo em pacientes com defeitos de barreira.

Outros parâmetros analisados neste estudo mostraram que a idade de início dos sintomas está de acordo com a literatura geral, visto que a doença costuma ser prevalente na infância e adolescência. Boa parte dos pacientes mantiveram sintomas até a fase adulta, o que está diretamente relacionado à gravidade, já que a média do SCORAD se manteve na faixa de doença moderada/grave, sendo os pacientes com ausência de mutação com média de SCORAD mais elevada.

Quanto à relação com sensibilização a aeroalérgenos, evidenciou-se mediana maior para Der p1 e Der p2 em pacientes que não apresentaram a mutação, bem como o valor de IgE total. Mutação em genes de proteínas relacionadas à manutenção da barreira cutânea adequada, como é o caso da *FLG*, torna os pacientes mais susceptíveis à entrada de alérgenos no organismo através da pele danificada, levando ao maior poder de sensibilização.

O presente estudo estimula a realização de futuros estudos multicêntricos e prospectivos, avaliando sistematicamente a fisiopatologia, clínica e gravidade da doença a fim de promover cada vez mais relação com tratamentos eficazes e direcionados para a origem do principal fator causador da doença.

## **6. Conclusões**

---

Após análise dos resultados concluiu-se que:

1. Em pacientes brasileiros com DA moderada a grave, a presença de pelo menos uma mutação nos genes *FLG* e/ou *FLG2* foi associada a maior tempo de doença. Dada a baixa frequência de mutação no gene *FLG*, esta diferença foi associada particularmente a presença da mutação S2377X no gene *FLG2*.
2. De forma inesperada, a gravidade da doença avaliada pelo SCORAD foi maior em pacientes sem mutações nos genes *FLG* e/ou *FLG2*, particularmente na ausência da mutação S2377X no gene *FLG2*, quando comparados àqueles com mutação. Este resultado sugere que outros fatores, incluindo a inflamação tipo 2 ou mutação em outros genes associados à manutenção da integridade da barreira cutânea, podem desempenhar papel mais importante na patogênese da DA em nosso meio.
3. É possível que a pesquisa de mutações com perda de função adicionais no gene *FLG* por técnicas de sequenciamento de nova geração possa revelar associações significativas.
4. Em pacientes brasileiros com DA moderada a grave, observou-se mutação R501X no gene *FLG* em pequeno número de pacientes e não esteve associada a gravidade da doença, tempo de doença, idade de início dos sintomas, IgE total, e sensibilização a aeroalérgenos.
5. Os resultados do presente estudo corroboram estudo prévio, que mostrou expressão normal de *FLG* em pele lesada de pacientes com DA, comparável à de indivíduos normais não atópicos, sugerindo que mecanismos adicionais à insuficiência de *FLG* causada geneticamente ou por resposta imune do tipo 2 são relevantes na patogênese da DA em nosso meio.



---

## ***7. Referências Bibliográficas<sup>1</sup>***

---

---

<sup>1</sup> Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

Addor FAS, Aoki V. Barreira cutânea na dermatite atópica. *An Bras Dermatol*. 2010;85(2):184-94.

Amaral CSF, March MFBP, Sant'Anna CC. Quality of life in children and teenagers with atopic dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2012;87(5):717-23.

Andersson AM et al. Assessment of biomarkers in pediatric atopic dermatitis by tape strips and skin biopsies. *Allergy*. 2022;77(5):1499-509.

Arehart CH et al. Polygenic prediction of atopic dermatitis improves with atopic training and filaggrin factors. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(1):145-55.

Asai Y et al. Filaggrin gene mutation associations with peanut allergy persist despite variations in peanut allergy diagnostic criteria or asthma status. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):239-42.

Batista DIS 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.

Baurecht H et al. Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1406-12.

Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008;358(14):1483-94.

Bieber T. How to Define Atopic Dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35(3):275-81.

Bieber T et al. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(4S):S58-S64.

Bin L, Leung DY. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2016;12:52.

Boguniewicz M et al. Expert perspectives on management of moderate-to-severe atopic dermatitis: A multidisciplinary consensus addressing current and emerging therapies. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(6):1519-31.

Broderick C et al. Biomarkers associated with the development of comorbidities in patients with atopic dermatitis: a systematic review. *Allergy*. 2022 Nov 10. doi: 10.1111/all.15578. Online ahead of print.

Brown SJ et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):661-7.

---

Brown SJ, Elias MS, Bradley M. Genetics in Atopic Dermatitis: Historical Perspective and Future Prospects. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(12):adv00163.

Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DY. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(4S):S65-S76.

Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Current Opinion in Immunology.* 2016;42:1-8.

Cardili RN. Polimorfismos do fator de necrose tumoral e dos antígenos leucocitários humanos HLA-C e HLA-G no sangue e expressão do HLA-G na pele de pacientes com psoríase. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2010.

Čepelak I, Dodig S, Pavić I. Filaggrin and atopic march. *Biochem Med (Zagreb).* 2019;29(2):020501.

Coghi S et al. Quality of life is severely compromised in adult patients with atopic dermatitis in Brazil, especially due to mental components. *Clinics (Sao Paulo).* 2007;62(3):235-42.

Cork MJ et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(8):1892-908.

Cowden JM et al. The histamine H4 receptor mediates inflammation and pruritus in Th2-dependent dermal inflammation. *J Invest Dermatol.* 2010;130(4):1023-33.

Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2(4):371-9.

Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Novel concepts of prevention and treatment of atopic dermatitis through barrier and immune manipulations with implications for the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1723-34.

de Guzman Strong C et al. A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: implications for atopic dermatitis and psoriasis. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1453-60.

de Jongh CM et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to chronic irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2008;58(5):269-77.

Dvornyk V et al. Filaggrin gene polymorphisms are associated with atopic dermatitis in women but not in men in the Caucasian population of Central Russia. *PLoS One.* 2021;16(12):e0261026.

---

Elias PM, Schmutz M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(5):437-46.

Ewald DA et al. Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(2):562-71.

Gao P-S et al. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):507-13.

Giardina E et al. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology*. 2008;216(1):83-4.

Grillo M et al. Pediatric atopic eczema: the impact of an educational intervention. *Pediatr Dermatol*. 2006;23(5):428-36.

Heede NG et al. Hand eczema, atopic dermatitis and laggrin mutations in adult Danes: a registry-based study assessing risk of disability pension. *Contact Dermatitis*. 2017;77(2):95-105.

Hertz A et al. Analysis of filaggrin 2 gene polymorphisms in patients with atopic dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2020;95(2):173-9.

Hoyer A et al. Filaggrin mutations in relation to skin barrier and atopic dermatitis in early infancy. *Br J Dermatol*. 2022;186(3):544-52.

Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1315-27.

Kim BE, Leung DYM. Epidermal barrier in atopic dermatites. *Allergy Asthma Immunol*. 2012;4(1):12-6.

Kupfer J et al. Structured education program improves the coping with atopic dermatitis in children and their parents – a multicenter, randomized controlled trial. *J Psychosom Res*. 2010;68(4):353-8.

Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2020;396(10247):34560.

Liang Y, Chang C, Lu Q. The genetics and epigenetics of atopic dermatitis-filaggrin and other polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(3):315-328.

Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(11):771-88.

Margolis DJ et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):784-9.

Margolis DJ. Atopic dermatitis: filaggrin and skin barrier dysfunction. *Br J Dermatol.* 2022;186(3):396.

Masataka O et al. Filaggrin-gene mutation has minimal effect on the disease severity in the lesions of atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2021;48(11):1688-99.

McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(12):280-91.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *Am Inst Chem Eng J.* 1975;21:985-96.

Mischke D et al. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol.* 1996;106(5):989-92.

Mohiuddin MS et al. Increased compound heterozygous filaggrin mutations in severe atopic dermatitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(5):534-536.

Mollanazar NK, Smith PK, Yosipovitch G. Mediators of chronic pruritus in atopic dermatitis: getting the itch out? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(3):263-92.

Moreno AS et al. Targeting the T Helper 2 Inflammatory Axis in Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;171(2):71-80.

Nakahara T et al. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2021;48(2):130-9.

Paller AS, Kabashima K, Bieber T. Therapeutic pipeline for atopic dermatitis: End of the drought? *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(3):633-43.

Palmer CNA 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.

Rodríguez E et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(6):1361-70.e7.

Salama RH et al. Missense, silent, non-sense and frame-shift mutations in exon 3 of the filaggrin gene in patients with bronchial asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis and mixed atopy. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2021;40(3):357-367.

Sandilands A et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1770-5.

---

Sandilands A et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nature Genetics*. 2007;39(5):650-4.

Schmitt J et al. Usage and effectiveness of systemic treatments in adults with severe atopiceczema: First results of the German Atopic Eczema Registry TREATgermany. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017;15(1):49-59.

Shamssain M. Trends in the prevalence and severity of asthma, rhinitis and atopic eczema in 6- to 7- and 13- to 14-yr old children from the north-east of England. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(2):149-53.

Shaw TE et al. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol*. 2011;13191):67-73.

Simpson EL et al. When does atopic dermatitis warrant systemic therapy? Recommendations from an expert panel of the International Eczema Council. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(4):623-33.

Smieszek SP et al. Correlation of age-of-onset of Atopic Dermatitis with Filaggrin loss-of-function variant status. *Sci Rep*. 2020;10(1):2721.

Smith FJD et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006;38(3):337-42.

Staab D et al. Age related, structured educational programmes for the management of atopic dermatitis in children and adolescents: multicenter, randomised controlled trial. *BMJ*. 2006;332(7547):933-8.

Stalder JF et al. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186(1):23-31.

Ständer S. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2021;384(12):1136-43.

Tejada CS et al. Impact on the quality of life of dermatological patients in southern Brazil. *An Bras Dermatol*. 2011;86(6):1113-21.

Thyssen JP et al. Filaggrin mutations are strongly associated with contact sensitization in individuals with dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2013;68(5):273-6.

Vardar Acar N et al. Rare occurrence of common filaggrin mutations in Turkish children with food allergy and atopic dermatitis. *Turk J Med Sci*. 2020;50(8):1865-71.

Weisshaar E et al. Itch intensity evaluated in the German Atopic Dermatitis Intervention Study (GADIS): correlations with quality of life, coping behaviour and SCORAD severity in 823 children. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(3):234-9.

Werfel T et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Immunol.* 2016;138(2):336-49.

Ying S et al. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(6):1386-8.

Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol.* 2010;11(4):289-93.