

VALÉRIA BOTAN GONÇALVES

**Parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos
do sangue periférico: uma nova ferramenta para
triagem de pacientes portadores de esofagite
eosinofílica**

TESE DE DOUTORADO

Brasília/DF

2015

TESE DE DOUTORADO

Parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos do sangue periférico: uma nova ferramenta para triagem de pacientes portadores de esofagite eosinofílica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular/ Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA

Brasília/DF

2015

Este trabalho foi desenvolvido com recursos de bancada da pós-graduação/CAPES e recursos de bancada da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

DEDICATÓRIA

TESE ANTITÉTICA

Estando assim, acordada...

Em mais uma longa noite e visando o doutoramento, enquanto minha pueril princesa dorme, alenteço o pensamento!

Reflexões singelas surgem então a cada momento. Escrevendo as páginas da vida, esse currículo da existência, vem-me o tormento ao fitar minha filha: teria me privado de seu tempo?

Lúcida, eu questiono, qual o meu pressentimento? Cada fala, cada sorriso e cada dente, e eu ali, incerta se flagrei tudo intensamente.

Fora a primeira a lhe perceber pronunciar uma graciosa palavra ou a elaborar um lindo gesto? Qual o papel da vida? Vamos ser honestos?

Desde que nascemos, papéis são preenchidos...

Tal quando morremos, convém. Mas pergunto novamente. Qual o papel da vida? Você quer viver também!

O tempo é o marca-passos da vida. É nesse tic-tac das horas que passamos correndo pelas belas paisagens do destino. E existe gente neste caminho, mas os olhos fatigados ou desatentos não lhes encaram mais. Perde-se o deixado pra trás. O cotidiano ofusca a beleza das coisas simples.

Fica cotidiano desumano?

Acordamos cedo, comemos, enfrentamos o trânsito, comemos de novo, trabalhamos, enfrentamos o trânsito de novo, voltamos ao lar e trabalhamos. Afinal dormimos tarde. E pronto, volta tudo ao início simbólico do dia a dia, com alguns problemas a resolver, alguns acidentes, algumas boas surpresas com a microscopia.

Ei, caminhante, observe o caminho! Eis que surge esta minha consciência atçando.

Ei, observe-o com carinho! Ele tem quem te ama, que te vê dormir na cama, que te vela em bom soninho... E te pede de mansinho, mais atenção, mais tempo, neste teu cotidiano! Pois se passa mais um ano... E a vida continua, com títulos ou papéis, júbilos ou troféus, mas compassivamente. Mas não será em vão tal sofrimento! A doação que me afasta da filha aproxima os outros dos seus, certamente por iguais valiosos momentos. E isso é grandioso! É assim que faz a vida, justificar o inaceitável. Ainda que afável, escreve em nosso currículo a mais indelével explicação.

Quer perguntemos ou não. Quer tese ou dissertação.

Pietro Alves (amigo e poeta)

Dedico este trabalho a um espírito iluminado que desde seu renascimento só trouxe alegria à minha vida e que, mesmo tão pequena, soube compreender muitos momentos da minha ausência.

À minha filha **Luiza**, a quem Deus colocou no meu caminho para meu amadurecimento pessoal e espiritual.

Saiba que mesmo nos momentos distantes de você, não houve qualquer segundo que eu esquecesse o quão maravilhoso é estar ao seu lado.

Não tenho palavras para expressar o amor que você conquistou em mim.

Obrigada por você existir !!!!

AGRADECIMENTOS

“... é impossível ser feliz sozinho...”

Tom Jobim

A Deus e aos Espíritos Protetores, pela vida e todo caminho semeado para realização deste trabalho.

A minha mãe Marilisa, por ter se esforçado ao longo de toda sua vida para me educar e ser sempre uma pessoa melhor. Todas as minhas vitórias também são suas!

Ao meu pai Adalberto, por ter me dado as ferramentas necessárias para meu crescimento pessoal e espiritual.

A professora e orientadora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelo carinho e compreensão com os quais me acompanhou neste trabalho; por ser exemplo de ética, dedicação profissional e bondade, pela paciência dedicada a mim nestes longos últimos 5 anos e por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor.

Ao Dr. Wellington Gonçalves Borges, amigo e meu ex-preceptor do Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, por ter me ensinado que é com dedicação e amor que se realiza a verdadeira medicina, por toda confiança em mim depositada e por acreditar que a cada dia eu posso ser um pouco melhor do que ontem. És meu exemplo nesta vida profissional que abracei.

À Shirley Couto, colega e pessoa imprescindível para realização deste trabalho com todo seu apoio técnico e científico para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Heinrich Saidler, patologista, que orientou em várias etapas da

realização deste projeto e foi o “caminho” para que eu concluísse este trabalho de forma íntegra e didática.

Aos profissionais técnicos do Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Unb: Elizabete Rodrigues Carrasco Abrão, Wallace Santos Cavalcante e Débora Pereira de Jesus, por todo apoio na realização dos experimentos.

A toda equipe do Laboratório do Hospital da Criança de Brasília, em especial ao Dr. Victor Luiz Guedes da Silva pelo apoio incondicional na coleta dos experimentos e pela amizade que desenvolvemos ao longo deste período.

À Virgínia Massote Paulinelli, Stefânia Gabriel, Ana Aurélia Rocha da Silva, Maria de Lourdes Jaborandy, José Tenório Almeida Neto, Renata Seixas, Flávio Ejima, médicos gastroenterologistas da cidade de Brasília, pelo apoio e encaminhamento de muitos pacientes desta pesquisa.

À Clarissa Honório, Maielly Pereira, Poliana Bicalho, Suelen Vieira e Hermínio Ramos, médicos residentes do Serviço de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Base do Distrito Federal, pelo apoio nos preenchimento dos protocolos e atendimento aos pacientes.

À colega Carmem Lívia Martins pelo apoio e empréstimo do microscópio para facilitar a leitura das lâminas.

À Tatiana Karla Borges e Érica Alessandra Alves Rocha, pela amizade, pelas palavras de apoio e pela realização da microscopia confocal e imunohistoquímica

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UnB, Danielle Miranda e Alessandro Ribeiro.

Em especial, a todos pacientes portadores de esofagite eosinofílica que, voluntariamente, participaram desta pesquisa. Muito obrigada!

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO.....	1
JUSTIFICATIVAS.....	19
OBJETIVOS.....	21
GRUPO DE ESTUDO E MÉTODOS.....	23
1. Delineamento dos experimentos	24
2. Grupo de Estudo e Caracterização dos indivíduos	26
2.1 Avaliação clínica inicial dos indivíduos.....	27
2.2 Critérios Endoscópicos.....	29
2.3 Critérios microscópicos das biópsias esofágicas.....	32
2.4 Critérios de Inclusão dos pacientes portadores de EoE.....	32
2.5 Critérios de Exclusão dos pacientes portadores de EoE	32
2.6 Critérios de Inclusão dos indivíduos controles.....	33
2.7 Contra-indicações gerais para o dia da coleta de sangue.....	33
3. AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS NOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES SADIOS	34
4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CICLOXIGENASE -2 E 5-LIPOXIGENASE NAS LÂMINAS DE BIÓPSIAS DE ESÔFAGO POR IMUNOHISTOQUÍMICA	35
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
RESULTADOS	37

1. PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES	38
1.1 ASSOCIAÇÕES COM OUTRAS ATOPIAS	41
1.2 FATORES DE RISCO E TEMPO DE DEMORA ATÉ O DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO	42
1.3 ESCORE CLÍNICO DOS PACIENTES PORTADORES DE EOE E CONTROLES	43
ANÁLISE DO TESTE DE PUNTURA COM LEITURA IMEDIATA (PRICK TEST) DOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE EOE	49
PARÂMETROS ENDOSCÓPICOS DOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES	50
PARÂMETROS MICROSCÓPICOS DAS BIÓSPIAS ESOFÁGICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE EoE	51
TRATAMENTO REALIZADO PELOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA	53
2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS	55
2.1. Análise comparativa do estado de ativação dos eosinófilos entre os grupos controles e portadores de esofagite eosinofílica	55
2.2. Correlação do escore de gravidade clínica dos pacientes portadores de esofagite com os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos	59
2.3. Avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos segundo o escore de gravidade clínica dos pacientes com EoE	60
2.4. Correlação do escore de gravidade clínica dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica com os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos	63
2.5 Correlação entre o escore endoscópico dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica e os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos	64
2.6 Avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos segundo escore de gravidade endoscópica dos pacientes portadores de EoE e controles	65

2.7 Correlação do número de eosinófilos encontrados nas biópsias esofágicas com os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico	70
2.8 Análise dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos entre pacientes sensibilizados e não sensibilizados para os alérgenos testados	71
2.9 Análise da expressão de cicloxigenase-2 e lipoxigenase-5 nos eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores de EoE	74
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	107
ANEXO 1: Parecer de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pela Plataforma Brasil...	108
ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Portador de EoE - Maior de idade).....	113
ANEXO 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Portador de EoE – Menor de idade).....	114
ANEXO 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Paciente controle).....	115
ANEXO 5: Termo de Anuência do Menor de Idade.....	117
ANEXO 6: Protocolo Clínico de Pesquisa.....	119
ANEXO 7: Perfil dos pacientes portadores de EoE.....	125
ANEXO 8: Perfil do grupo controle.....	127
ANEXO 9: Tabela com resultado do prick test dos pacientes portadores de EoE.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LOX	Enzima 5-lipoxigenase
ARJ	Artrite Reumatóide Juvenil
BAFF	Fator ativador de linfócito B

C5a	Fator do complemento C5a
C6	Vértebra cervical 6
CCR3	Receptor de quimiocina tipo 3
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD11b	<i>Cluster of Differentiation</i> 11b (integrina alfa)
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPH II	Complexo Principal de Histocompatibilidade II
DF	Distrito Federal
DMB	Diaminobenzidina
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilos
EE	Esofagite erosiva
EET	<i>Eosinophil Extracellular Trap</i>
EoE	Esofagite eosinofílica
EPO	Peroxidase derivada do eosinófilo
FasL	Fas ligante
FCεRI	Receptores de alta afinidade para IgE
IBP	Inibidor da Bomba de Prótons
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INFγ	Interferon gama
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
Lta2	Linfócito T auxiliar 2
MIC	<i>Major histocompatibility complex (MHC) class I chain related</i>
MS	Ministério da Saúde Brasileiro
NFκB	Fator nuclear κB
NKG2D	Receptor <i>Natural Killer cell</i> group 2 D
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
PBP	Proteína Básica Principal
PMP	Padrões moleculares de patógenos
PS	Pronto Socorro
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro

r^P	Coeficiente de correlação de Pearson
r^S	Coeficiente de correlação de Spearman
RT-PCR	Reação de cadeia de polymerase em tempo real
STAT-6	<i>Signal transducer and activator of transcription-6</i>
STF	Solução salina tamponada com fosfato
T11	Vértebra torácica 11
T12	Vértebra torácica 12
Ta1	Subpopulação de linfócito T auxiliar 1
Ta2	Subpopulação de linfócito T auxiliar 2
TCR	Receptor do linfócito T
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulatório
Ube	Unidade básica equivalente
WHO	World Health Organization

RESUMO

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença emergente mundialmente, com patogênese ainda pouco compreendida. Trata-se de uma doença imuno-antígeno mediada, crônica, caracterizada, clinicamente, por sintomas relacionados à disfunção esofágica e, histologicamente, por uma predominante inflamação mediada por eosinófilos. Existe consenso mundial que a presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento na biópsia esofágica caracteriza histologicamente a doença. Assim, para confirmação diagnóstica é estritamente necessária a realização de endoscopia digestiva alta com biópsia esofágica. O acompanhamento da evolução da EoE tem se mantido com múltiplas endoscopias digestivas altas seguido por biópsias. Os eosinófilos desempenham papel central neste processo inflamatório, sendo atualmente, o alvo de várias pesquisas no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, principalmente não invasivos, para controle da EoE. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se os parâmetros quantitativos de ativação dos eosinófilos podem auxiliar como método de triagem diagnóstica em pacientes portadores de esofagite eosinofílica. Tratou-se de um estudo transversal, onde foram selecionados 31 pacientes portadores de EoE e 10 pacientes controles, dos quais foram retirados 10 ml de sangue periférico, após consentimento informado. O estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico foi avaliado por parâmetros morfológicos após aderência destas células à lâmina. Os seguintes parâmetros morfológicos foram quantificados: eosinófilos normais, espraiamento, arredondamento, presença de pseudópodes localizados e generalizados, emissão de grânulos de pequena, moderada e grande quantidade, presença de vacúolos, presença de grânulos isolados, degeneração celular e comunicação celular. Observamos que o número de eosinófilos no sangue periférico com características normais foi significativamente menor nos indivíduos portadores de esofagite eosinofílica do que nos indivíduos controle. Este parâmetro foi capaz de discriminar todos os indivíduos portadores de EoE estudados dos indivíduos do grupo controle não portadores da doença, com sensibilidade de 100% para detecção da EoE nos indivíduos estudados. Todos os parâmetros morfológicos, exceto contato celular, presença de grânulos em pequena quantidade e emissão de pseudópodes generalizados, foram maiores nos pacientes portadores de EoE, conseguindo discriminar a doença. Entretanto, não observamos correlação de gravidade clínica, endoscópica ou histológica

pela utilização dos parâmetros periféricos de ativação dos eosinófilos. Mostramos, de forma inédita, que o teste de ativação dos eosinófilos do sangue periférico caracterizados por parâmetros morfológicos é capaz de triar pacientes sintomáticos portadores de EoE para a realização de endoscopia digestiva alta e que este método é acurado, de fácil realização e poderá ser um teste útil para auxiliar na definição do diagnóstico nos pacientes portadores de EoE.

ABSTRACT

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a worldwide emerging disease with poorly understood pathogenesis. It is a chronic immune/antigen mediated disease, clinically characterized by symptoms related to esophageal dysfunction and histologically by a predominant eosinophilic inflammation in the esophagus. There is a global consensus that the presence of ≥ 15 eosinophils per high power field, histologically characterize the disease. Diagnosis and treatment response monitoring in EoE requires endoscopical and histological examination of the esophagus. Eosinophils play a central role in the inflammatory process, currently being the target of several research to develop new diagnostic methods, especially non-invasive, for control of EoE. Therefore, this work aimed to assess whether morphological changes associated with activation of eosinophils in peripheral blood could be a useful noninvasive test to screen for EoE. This was a cross sectional study where 31 EoE patients and 10 controls were evaluated. Peripheral blood was drawn to evaluate the activation state of peripheral blood eosinophils, after informed consent. Eosinophils were evaluated by morphological criteria after adhesion to the slide. The following morphological parameters were evaluated: normal eosinophils, spreading, rounding, presence of localized and generalized pseudopods, release of small, moderate and large quantity of granules, cytoplasmatic vacuoles, cluster of free eosinophils granules, cell degeneration and cell communication. The number of eosinophils in the peripheral blood with normal characteristics was significantly lower in individuals with eosinophilic esophagitis than in control subjects. This parameter was able to discriminate all individuals with EoE studied compared with the control group, with 100% sensitivity for detection of EoE in the subjects studied. All morphological parameter settings except cell communication, release of granules in small amount and presence of generalized pseudopods were higher in patients with EoE, being able to discriminate the disease. However, no correlation was found among the activation state of peripheral blood eosinophils and clinical severity, endoscopic or histological parameters. We show, in an unprecedented study, that eosinophil morphological activation evaluation might be a useful test to screen for eosinophilic esophagitis and it may help to adequately make

the decision to indicate endoscopic examination to symptomatic patients, avoiding unnecessary endoscopy.

INTRODUÇÃO

DEFINIÇÃO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Descrita há aproximadamente 20 anos, por Attwood e cols. (1993), a esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença inflamatória crônica, imuno/antígeno mediada caracterizada por sintomas de disfunção esofágica e uma predominante inflamação eosinofílica na mucosa do esôfago (Chehade e cols., 2013; Dellon e cols., 2013). Damask (2015) acrescenta que, atualmente, a EoE é definida como uma condição clinicopatológica caracterizada pela inflamação eosinofílica localizada no esôfago, sem envolvimento de outras partes do trato gastrointestinal, associada a sintomas de disfunção esofágica e falha na resposta terapêutica adequada com inibidor de bomba de prótons (IBP).

O diagnóstico histológico realizado no material obtido por biópsia do esôfago é definido pela presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento (40x). Para definição diagnóstica são recomendadas a análise de 2 a 4 amostras do esôfago tanto proximal quanto distal, independente da aparência de normalidade ao exame endoscópico, sendo que em cerca de 25% dos casos a mucosa do esôfago tem aparência normal (Dellon e cols., 2013 e Ferreira e cols., 2008). Estudos apontam que a sensibilidade diagnóstica do exame histopatológico pode chegar a 100% quando 5 amostras de biópsias esofágicas são coletadas (Chehade e cols., 2013). Sheiko e cols (2015), em um estudo de coorte retrospectivo, no qual analisaram 1000 endoscopias digestivas alta com biópsias de crianças do Hospital Infantil do Colorado, compararam a sensibilidade diagnóstica dos resultados dos exames das endoscopias digestivas alta com os resultados da histopatologia das biópsias realizadas durante a EDA, e cujos laudos foram realizados por patologistas. Observaram que somente 5,6% das crianças tiveram diagnóstico endoscópico de EoE, e quando foi associada à análise histopatológica da biópsia, o diagnóstico da doença aumentou para 7,8%. Trinta por cento das endoscopias eram normais, mas apresentavam eosinófilos à análise microscópica, demonstrando que não há concordância entre os achados endoscópicos e microscópicos, principalmente na faixa etária pediátrica.

A incidência e prevalência desta doença vem aumentando gradativamente. Noel (2004) reportou entre os anos de 2000 a 2003 um aumento

de 1/10.000 para 4/10.000 pacientes portadores de EoE, nos Estados Unidos. De todos os casos diagnosticados, 20% são pacientes jovens com idade inferior a 18 anos e mais de 70% são do sexo masculino (Noel, 2004; Damask 2015). A doença é mais frequente em pacientes atópicos, portadores de alergia alimentar, asma e rinite alérgica.

Quanto à prevalência, estudos epidemiológicos indicam que EoE é tão prevalente quanto as demais doenças inflamatórias intestinais, exceto doença celíaca, podendo afetar entre 40 a 55 indivíduos por 100.000 habitantes (Chehade e cols., 2013). Entretanto, como a EoE só foi reconhecida e caracterizada como uma entidade separada nos últimos anos, muitos pacientes já foram erroneamente diagnosticados como portadores de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) (Ferreira e cols, 2008).

Na infância, a incidência também se encontra aumentada. Noel (2003) realizou o primeiro estudo de incidência/prevalência em crianças residentes em Ohio, nos Estados Unidos. Seguiu a definição histopatológica utilizada anteriormente, considerando mais do que 24 eosinófilos/campo, hiperplasia da camada basal e ausência de eosinófilos nos demais seguimentos intestinais. A incidência aumentou de 9.1 casos/100.000 habitantes em 2000 para 12.8 casos/100.000 habitantes em 2003, e a prevalência aumentou de 9.9 casos para 43 casos em 100.000 crianças no mesmo período. Chehade e Sampson (2008) acreditavam que a prevalência da doença fosse muito maior do que a relatada por vários autores, pois comumente alguns parâmetros sugestivos eram negligenciados pelos médicos, que não consideravam alguns relatos de pacientes como: demorarem mais para realizar uma refeição que os demais familiares, necessitarem de ingestão abundante de líquidos durante as refeições e a necessidade de cortar os alimentos em pedaços pequenos para deglutir, principalmente carnes e pães. O que não se pode estabelecer claramente é se este aumento da incidência/prevalência deve-se ao fato das doenças alérgicas estarem aumentando no mundo, como a rinite alérgica e a asma ou se a doença EoE e o seu diagnóstico tornou-se melhor estabelecido e mais reconhecido pelos médicos.

Outro ponto de igual interesse é a determinação da prevalência de pacientes portadores de EoE que apresentam sintomas semelhantes à doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), especialmente, na faixa etária pediátrica.

Liacouras e cols, em 1998, avaliaram 1809 crianças portadoras de DRGE e destas 214 foram submetidas à endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsia esofágica. Vinte crianças (9,3%) possuíam critérios endoscópicos e microscópicos para EoE, e a grande maioria delas eram pobre respondedoras a medicações antiácidas para tratamento da DRGE.

Dentre os pacientes, principalmente do sexo masculino, que apresentam história de impactação alimentar, a incidência de EoE variou entre 48% a 54%, nos anos de 2004 a 2005 (Desai e cols., 2005). Além disso, a predisposição genética para EoE já está bem documentada. Em uma série de casos, entre as 381 crianças portadoras de EoE, 7% dos pais referiam história de disfagia, impactação alimentar ou mesmo evidências histológicas de EoE (Liacouras e cols., 2005). Esta susceptibilidade genética deve-se ao polimorfismo de um único nucleotídeo que codifica o gene da eotaxina-3, considerada proteína chave promotora do recrutamento dos eosinófilos para o esôfago.

ETIOLOGIA

O papel dos alérgenos alimentares na esofagite eosinofílica

Há inúmeros estudos que apontam a EoE como um quadro de alergia alimentar mista (IgE e não IgE mediada). Spergel e cols. (2002) demonstraram este fenômeno pela análise dos testes de puntura imediata (*prick test*) combinada com os testes de contato de leitura tardia (*patch test*) em crianças portadoras de EoE. Vinte e seis crianças foram instruídas a evitarem os alimentos positivos em ambos os testes por 6 semanas e 69% delas tiveram resolução completa do quadro clínico. Em 1995, Kelly e cols., estudaram dez crianças portadoras de DRGE refratárias ao tratamento com antiácidos e fundoaplicatura de Nissen, foram os primeiros a referirem que algum ou alguns alimentos seriam a causa da presença dos eosinófilos no esôfago. Realizaram biópsias esofágicas nessas crianças e encontraram uma média de 41 eosinófilos/campo de grande aumento no exame histopatológico. Após 6 semanas de tratamento com dieta elementar (fórmula de aminoácidos livres) houve total redução dos sintomas e diminuição do número de eosinófilos na mucosa do esôfago (média 0,5 eosinófilos/campo de grande aumento) em 80%

destas crianças. Quando tais alimentos foram reintroduzidos, observou-se retorno dos sintomas clínicos, apesar do *prick test* permanecer negativo.

Reações alérgicas a dois alimentos é a média que ocorre dentre as reações alimentares nos pacientes portadores de EoE (variando de 1 a 6 alimentos) (Chehade e Sampson, 2008). Os alimentos mais implicados são leite de vaca, soja, trigo, ovo, amendoim e frutos do mar. Kagalwalla e cols. (2006), empiricamente, removeram estes seis alimentos da dieta de 35 crianças portadores de EoE e após 6 semanas encontrou acentuada melhora dos sintomas clínicos e dos achados histopatológicos, apesar de 74% dos pacientes não terem apresentado resolução completa da doença.

Quando há história de reações imediatas, uma IgE específica para alérgeno alimentar está presente em aproximadamente 15% nos pacientes portadores de EoE. Quando há múltiplas sensibilizações a alimentos detectadas pelo teste de puntura (*prick test*) ou pela presença de Imunoglobulinas E específicas, há menor evidência de que os alérgenos sejam o gatilho para o início dos sintomas da EoE (Liacouras e cols., 2011).

Os alimentos mais frequentemente reagentes positivos pela via da IgE, detectados pelo *prick test* são leite de vaca, ovo, amendoim, frutos do mar, carne, peixe, tomate e trigo, segundo dados observados em população de indivíduos americanos (Chehade e Sampson, 2008). Na via não IgE mediada, com participação dos linfócitos e analisada pelos testes de contato de hipersensibilidade tardia, os alimentos que mais frequentemente apresentaram positividade ao teste foram trigo, milho, carne, leite, soja, centeio, ovo, frango, aveia e batata. Um dos grandes problemas desta via é a ausência de padronização dos testes de contato para alimentos, os antígenos alimentares usados e a interpretação dos resultados. Esse teste de diagnóstico alimentar na EoE ainda precisa ser melhor caracterizado. Entretanto, o valor preditivo positivo do *prick test* IgE mediado para alérgenos alimentares em crianças varia de 30% a 90% (Spergel e cols., 2012).

Em pacientes adultos, as dietas elementares tornam-se difíceis de serem realizadas pela baixa adesão do paciente ao tratamento, bem como a análise dos resultados da exclusão de um ou mais alimentos, então o papel dos alérgenos alimentares ainda continua bastante controverso.

Peterson e cols. (2013) estudaram 18 adultos portadores de EoE e todos

os pacientes utilizaram dieta elementar somente com fórmula de aminoácidos livre e após 2 a 4 semanas o número de eosinófilos das biópsias esofágicas diminuiu de 54 para 10 células por campo de grande aumento. Quando se compara os resultados de exclusão dietética em crianças com adultos, os resultados apresentam diferenças acentuadas. Em crianças o sucesso terapêutico pode chegar a 70%, quando comparado com 30% em adultos (Chehade e Sampson, 2008). Tem sido sugerido que essa diferença deve-se ao fato de que realizar dietas muito restritivas em adultos são de difícil aderência pelos pacientes.

O papel dos aeroalérgenos na esofagite eosinofílica

O papel dos aeroalérgenos no desencadeamento da EoE é assunto cada vez mais discutido e estudado nos últimos dois anos. Os primeiros estudos avaliando o papel dos aerolérgenos foram feitos em murinos. A instilação intranasal de aeroalérgenos como *Aspegillus*, poeira doméstica e barata foi capaz de ocasionar eosinofilia esofágica (Rothenberg 2009, Blanchard e cols., 2006).

Vários estudos demonstram a relação de algumas estações do ano com o aumento da incidência de EoE, sendo mais comumente diagnosticada na primavera e outono, devido ao processo de polinização, que ocorre nos países localizados no hemisfério norte (Demask, 2015). Aceves (2014) descreve que pacientes portadores de EoE e sensibilizados a aeroalérgenos, ao realizar uso de imunoterapia antiácaro apresentam melhora clínica e histológica da esofagite, sendo este tratamento alvo atual de alguns pesquisadores no controle da EoE, embora mais estudos sejam necessários para total comprovação da eficácia da imunoterapia anti-ácaro no tratamento da EoE.

O papel da doença do refluxo gastroesofágico na esofagite eosinofílica

Os achados histopatológicos da EoE e da DRGE se sobrepõem, incluindo

a eosinofilia esofágica nas biópsias. Em muitos pacientes, a distinção dos sintomas entre doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE) e EoE é de difícil realização e uma doença pode estar contribuindo para a imunopatogênese da outra. (Molina-Infante e cols.,2011 e Liacouras e Ruchelli, 2004)

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, ENDOSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Os sintomas clínicos são muito variados e dependem da idade do paciente. Crianças com até 3 anos de idade apresentam sintomas inespecíficos como dificuldade para alimentação (vômitos, regurgitação ou recusa alimentar) que resultam em dificuldade de ganho ponderal. Durante a infância, vômitos, dores abdominais ou retroesternais são relatadas (Dellon e cols., 2013). Liacouras (2003) encontrou aproximadamente 10% de crianças com suspeita diagnóstica de DRGE não responsivas a terapia com antiácido cuja definição diagnóstica posterior mostrou tratar-se de EoE.

Nos adolescentes e adultos jovens, refluxo gastroesofágico e impactação do bolo alimentar são os sintomas mais frequentes. Vale ressaltar que os sintomas relacionados ao refluxo gastroesofágico (DRGE), nos portadores de EoE, não melhoram mesmo com terapia específica e estudos recentes indicam que 10 a 50% dos homens com sintomas de refluxo gastroesofágico são portadores de EoE (Straumann e cols., 2003).

Os achados endoscópicos típicos da EoE são anéis, estrias ou sulcos esofágicos, pontilhados esbranquiçados e estreitamento com redução do calibre esofágico (Katzka, 2015). Entretanto, esôfago com aspecto normal ao exame endoscópico não exclui o diagnóstico de EoE e pode-se apresentar em até 30% dos pacientes portadores da EoE (Gonçalves e cols., 2005).

Nos achados microscópicos, além da presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento, observam-se: densa eosinofilia na mucosa esofágica (Katzka, 2015; Damask, 2015); proliferação de células da camada basal em resposta a provocação alérgica, o que não ocorre com a provocação ácida oriunda do refluxo gastroesofágico (Atkins e cols., 2010); menor expressão da ciclooxygenase 2 (COX-2) (Blanchard e cols., 2011); aumento de células dendríticas (apresentadoras de antígeno) e mastócitos (Atkins e cols; 2010) fibrose da lâmina própria e formação de microabscessos eosinofílicos.

MANIFESTAÇÕES LABORATORIAIS

Eosinofilia periférica é um achado comum, em geral, os pacientes apresentam mais do que 700 células/mm³. Níveis elevados de IgE total e contra antígenos alimentares ou aeroalérgenos também estão presentes nos pacientes portadores de EoE (Valent e cols, 2012; Simon e cols., 2007).

PATOLOGIA E IMUNOPATOGENESE

O esôfago normal

O esôfago normal é um tubo muscular, altamente distensível, que se estende da faringe, ao nível da vértebra C6, até a junção gastroesofágica, ao nível das vértebras T11 ou T12. A parede esofágica é composta por mucosa, submucosa, muscular própria e camada adventícia, refletindo a organização geral do trato gastrointestinal. A mucosa esofágica é composta por 3 partes: epitélio escamoso estratificado não queratinizado, lâmina própria e muscular da mucosa. A camada epitelial é composta por células escamosas maduras sobrepostas às células basais que possuem grande potencial proliferativo. Estas células ocupam de 10% a 15% da espessura da camada epitelial (Chehade e Sampson, 2008). Na porção mais profunda da camada epitelial encontram-se algumas células dendríticas, poucos linfócitos e raramente, alguns mastócitos, outras células do sistema imune estão ausentes, como os eosinófilos. A lâmina própria é composta por tecido conectivo, estruturas vasculares e leucócitos. A camada muscular consiste em bandas de músculo liso orientadas longitudinalmente (Terris e Potet, 1995).

Abaixo da mucosa, está a camada submucosa composta por tecido conectivo frouxo, vasos sanguíneos, uma rica rede de vasos linfáticos, alguns leucócitos, fibras nervosas, alguns folículos linfoides e glândulas submucosas. Estas glândulas se comunicam com o epitélio escamoso estratificado e secretam

fluidos contendo mucina que lubrificam o tubo esofágico (Terris e Potet, 1995).

A combinação da peristalse esofágica, a presença do esfíncter esofágico na junção esofagogástrica, barreira epitelial escamosa, os fluidos oriundos da saliva e das glândulas submucosas e as células do sistema imune contribuem para defesa do esôfago contra injúrias (Chehade e Sampson, 2008). Ainda influi no mecanismo de tolerância imunológica a presença da filagrina que mantem a barreira esofágica íntegra, evitando a passagem de partículas protéicas que poderiam causar um processo de sensibilização (Rothenberg, 2009).

Imunopatogênese

A patogênese da EoE envolve fatores ambientais e genéticos, particularmente reações de hipersensibilidade imediata (IgE) e tardia (não IgE) à antígenos alimentares/ aeroalérgenos. Histologicamente, a EoE é caracterizada por um infiltrado acentuado de eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas e mastócitos.

Estudos sugerem que a patogênese da EoE se inicia, em indivíduo geneticamente susceptível, no qual algum alérgeno alimentar ou aeroalérgeno ativa o sistema imune ligando-se às células apresentadoras de antígenos, induzindo uma resposta Th2 com produção de citocinas deste padrão como IL-5 e IL-13. Na circulação periférica destes pacientes, encontra-se um aumento no percentual de linfócitos CD4⁺ expressando altos níveis de IL-5 quando comparado com indivíduos não atópicos (Blanchard e cols., 2011).

O papel dos linfócitos T, linfócitos B e a via Th2 na esofagite eosinofílica

Os linfócitos T estão em número aumentado nos pacientes portadores de EoE quando comparados aos pacientes controles, demonstrado por análise de imunohistoquímica com marcação para células CD3⁺ (Lucendo e cols.; 2007). Tanto linfócitos T auxiliares (CD4⁺) quanto linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) estão presentes, com nítida predominância dos linfócitos T CD8⁺ (Chehade e cols., 2013) e ocorre diminuição da concentração de ambos após tratamento com corticóide tópico (Lucendo e cols., 2007).

A análise de camundongos nocauteados para linfócitos T CD3⁺ mostrou o papel importante destas células na patogênese da EoE, uma vez que mesmo com estímulos alergênicos, como instilação nasal de aeroalérgenos, estes animais não desenvolveram EoE. A IL-5 também apresenta papel importante, principalmente no processo de regulação dos eosinófilos na parede esofágica e linfócitos CD4⁺ oriundos de pacientes portadores de EoE secretam níveis elevados de IL-5 (Blanchard e cols, 2006).

Yamazaki e colaboradores (2006) estudaram as citocinas produzidas pelas células mononucleares no sangue periférico em 15 adultos portadores de EoE. Incubaram as referidas células, *in vitro*, com nove diferentes extratos de alérgenos alimentares e aeroalérgenos e compararam com indivíduos saudáveis. Observaram uma significativa secreção de citocinas do padrão Th2 como IL-5 e IL-13 em resposta aos vários alérgenos.

Mishra e cols. (2001) instilaram antígenos de *Aspergillus fumigatus*, via nasal, em modelos murinos cujo resultado foi infiltração pulmonar e esofágica de eosinófilos. No grupo em que foi usado *Aspergillus fumigatus* foram encontrados duas vezes mais linfócitos B e cinco vezes mais linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparados ao grupo de camundongos controle que recebeu somente instilação nasal de solução salina.

Em humanos, o papel dos linfócitos na EoE ainda precisa ser melhor esclarecido. Está bem estabelecido que os linfócitos B secretam IgE que contribuem para a quantidade de imunoglobulinas E específicas que são produzidas no epitélio do esôfago. Estas IgEs ligam-se aos mastócitos e desencadeiam toda a cascata de liberação de mediadores químicos inflamatórios da via de reação de hipersensibilidade imediata relacionada à alergia (Chehade e Sampson, 2009).

O gene que codifica a eotaxina-3 é o que apresenta maior expressão nos pacientes com EoE. Amostras de biópsias esofágica incluídas em parafina mostraram níveis elevados de RNA mensageiro para eotaxina-3 em pacientes com EoE quando comparados com pacientes portadores de DRGE.

Existe uma forte associação entre EoE e doença celíaca, esta similaridade provém do fato de ambas possuírem os mesmos mecanismos patogênicos. A doença celíaca é um protótipo de doença imuno-mediada por linfócitos T desencadeada contra o antígeno oral gliadina. Apesar da doença celíaca possuir

um componente auto-imune ainda não descrito na EoE, ambas doenças estão associadas com uma resposta imune celular contra epitélio, sendo esta resposta reversível com a eliminação do antígeno da dieta (Rothenberg, 2009 e Talley e cols.; 1992).

A análise do transcriptoma em indivíduos com EoE mostrou a expressão de genes hiper ou hiporregulados no tecido esofágico desses pacientes, quando comparado com tecido esofágico de indivíduos normais. Estes genes estão associados à resposta imune e à doença celíaca. Existe a superexpressão de genes que codificam o MICA e MICB (ligantes que ativam NKG2D) e a interleucina 15 (IL-15), todos associados a ativação de linfócitos intraepiteliais (Papadopoulou e cols; 2014). Blanchard e cols. (2006) examinaram o RNA de biópsias esofágicas de 6 controles e treze pacientes pediátricos portadores de EoE. Eles encontraram um transcriptoma no qual 230 genes estão hiporregulados e 344 genes hiperregulados, sendo mais drasticamente aumentada a expressão do gene que codifica a eotaxina-3.

Outros genes que cuja expressão se encontra alterada pela análise do transcriptoma em pacientes com EoE, e são regulados pela IL-13, incluem a periostina, induzida pela IL-13 e hiperexpressa na EoE e a filagrina que é contra regulada pela IL-13 e está diminuída nos tecidos dos pacientes com EoE. Periostina é uma molécula da matriz extracelular que regula a adesão eosinofílica e promove o recrutamento de eosinófilos via eotaxina. A filagrina é uma proteína estrutural da pele e a perda da sua função está associada a permeabilidade cutânea e susceptibilidade à dermatite atópica e nos pacientes com EoE, tem influência na permeabilidade da barreira epitelial esofágica. Um aspecto importante a ser considerado é que a IL-13 contra regula a expressão de filagrina nas células epiteliais, promovendo um mecanismo pelo qual antígenos alimentares ativam a imunidade adaptativa Th2, o que pode alterar a função de barreira esofágica, talvez propagando o processo inflamatório local e o aumento da absorção antigênica pelas células epiteliais e apresentadoras de antígenos.

A IL-5 também apresenta papel importante, principalmente no processo de regulação dos eosinófilos na parede esofágica e linfócitos CD4⁺ oriundos de pacientes portadores de EoE que secretam níveis elevados de IL-5 (Chehade e Sampson, 2008).

O papel das células dendríticas na esofagite eosinofílica

As células dendríticas esofágicas são chamadas de células de Langerhans e situam-se nas camadas mais profundas da basal e suprabasal. São potentes células apresentadoras de antígenos, pois expressam na sua superfície o complexo principal de histocompatibilidade classe II (CPH II). A função destas células é capturar os antígenos alimentares/aeroalérgenos via CPH II e apresentá-los aos linfócitos T auxiliares, que no caso da EoE demonstram predominância dos LTa2, dando início a produção de citocinas como IL-5, IL-13, que recrutam mais eosinófilos para o epitélio esofágico (Chehade e Sampson, 2008).

O papel dos mastócitos na esofagite eosinofílica

Os mastócitos encontram-se em número elevado no epitélio esofágico de pacientes portadores de EoE. Em contraste com os eosinófilos, os mastócitos estão localizados nas camadas mais profundas do epitélio esofágico, juntamente com os linfócitos e as células dendríticas e têm seu número reduzidos quando os pacientes são submetidos aos tratamentos propostos para EoE (Chehade e Sampson, 2008).

Similar aos eosinófilos, os mastócitos também se encontram ativados no epitélio do esôfago dos pacientes portadores de EoE. Elevados níveis de triptase foram encontrados, por microscopia eletrônica, demonstrando a desgranulação destas células. É possível que a comunicação entre mastócitos e eosinófilos contribuam para o desenvolvimento dos achados histopatológicos da EoE, em humanos. A presença de triptase oriunda dos mastócitos, estimula a secreção de IL-8, uma citocina que também participa do processo de migração eosinofílica para o esôfago (Kirsch e cols.; 2007).

O papel dos eosinófilos na esofagite eosinofílica

Os eosinófilos recebem atenção especial nesta doença por serem as células marcadoras da doença. Estão em número significativamente aumentado no epitélio dos portadores de EoE, quando comparados com pacientes portadores de DRGE ou controles (Markowitz e cols.; 2003). O encontro de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento no epitélio esofágico caracteriza o principal aspecto histológico da doença e estes eosinófilos diminuem de quantidade quando o paciente é submetido a dietas de restrições adequadas e/ou tratamento com corticóides (Kagalwalla e cols.,2006).

Na circulação sanguínea periférica, eosinofilia ocorre em somente 50% dos pacientes portadores de EoE, segundo Teintelbaum e cols. (2002).

Os eosinófilos são recrutados da circulação principalmente pela produção local esofágica de IL-5 e eotaxina (Valent e cols, 2012;Bochner, 2000). Em ratos deficientes para eotaxina, o recrutamento de eosinófilos para o esôfago é atenuado quando comparado com ratos selvagens. Ratos nocauteados para IL-5, mesmo após instilação oral de alérgenos, não apresentam eosinófilos no esôfago, demonstrando que esta citocina é fundamental para presença destas células nos portadores de EoE (Chehade e Sampson, 2008). A IL-13, outra citocina do padrão Ta2, também se demonstrou tão importante quanto a IL-5 no recrutamento de eosinófilos nos pacientes portadores de EoE. Toda esta produção de citocinas padrão Ta2 inicia com o sinal transdutor ativador STAT-6.

Estudos em modelos animais demonstraram que o desvio para a ativação da via T auxiliar 2 (Ta2) é crucial para o desenvolvimento da EoE, uma vez que camundongos nocauteados para STAT-6 não desenvolvem a doença, mesmo com instilação via esofágica de IL-13. A IL-13 encontra-se em níveis elevados no epitélio de pacientes com EoE e induz a produção de quimioatraentes para eosinófilos, como a eotaxina-3, por mecanismos transcripcionais nas células epiteliais esofágicas (Rothenberg, 2009). Esta citocina tem um papel fundamental na patogênese da EoE. As células epiteliais esofágicas estimuladas, *in vitro*, com IL-13 produzem altos níveis de eotaxina-3 e estes níveis parecem se correlacionar com a gravidade e progressão da doença (Blanchard e cols., 2007).

Em humanos, os achados encontrados nos modelos experimentais, também se assemelham. Pela análise da expressão gênica em biópsias esofágicas obtidas de crianças portadoras de EoE por *microarray* (*genome-wide*

microarray expression analysis), o gene que codifica a eotaxina-3 apresentou expressão significativamente maior quando comparado com crianças saudáveis (Blanchard e cols., 2006).

Tem sido sugerido que não é somente o número aumentado de eosinófilos no epitélio dos pacientes portadores de EoE que desempenham o desenvolvimento desta doença. O papel dos grânulos tóxicos dos eosinófilos, como grânulos citoplasmáticos, como a proteína básica principal (PBP), neurotoxinas derivadas do eosinófilo tem sido sugerido participar do processo de lesão (Virshup, 2014). Já foi demonstrado, por imunohistoquímica, que em biópsias de crianças portadores de EoE, a PBP foi encontrada ao redor das células eosinofílicas, demonstrando o processo de desgranulação destes eosinófilos na parede esofágica. A intensidade da desgranulação não se correlacionou com o número de eosinófilos presentes no epitélio esofágico, sugerindo que o número absoluto de eosinófilos tem pouca relação com a gravidade da doença (Chehade e cols.; 2007). Este achado demonstra a discordância entre o número de eosinófilos presentes no epitélio e o grau de ativação dos mesmos..

O potencial de evolução para fibrose na lâmina própria tem sido relacionado com a capacidade de ativação dos eosinófilos no tecido esofágico e não pela extensão do infiltrado, e este achado é um marcador histológico para o remodelamento esofágico e tem valor preditivo para desenvolvimento da disfagia observada nos pacientes com EoE (Cheng e cols., 2012).

Na patogênese da EoE, apesar dos alérgenos serem os gatilhos para iniciar o processo inflamatório, os fatores que perpetuam esta inflamação não estão completamente elucidados. Tem sido demonstrado que os eosinófilos uma vez ativados secretam produtos extracelulares, conhecidos como *eosinophil extracellular traps* (EETs) que foram detectados em todas as amostras de 18 pacientes portadores de EoE, estudados por Simon e cols. (2015). Verificaram que com a liberação destes grânulos há produção de IL-5, INF- γ ou moléculas de adesão seguidas pela ativação do fator complemento 5a (C5a), lipopolissacarídeos e linfopoetina tímica (TSLP), como também já observado em outras atopias como asma e dermatite atópica. Neste caso, esta “rede de proteínas” atuam por dar continuidade ao processo inflamatório no esôfago e ainda causam danos epiteliais na barreira esofágica, como detectado neste

estudo, pela menor expressão de filagrina nos pacientes com EoE quando comparado aos controles ($p=0,006$), assim microorganismos estão aptos para invadir o epitélio e promover/perpetuar a inflamação. Os mesmos autores relatam que na EoE há maior produção de IL-25, IL-32 e IL-33, todas promotoras da via $Ta2$. A IL-25 tem sido reportada por aumentar o tempo de sobrevivência dos eosinófilos e estimular a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e IL-6 pelos eosinófilos. A IL-32, produzida pelas células epiteliais devida a estimulação com citocinas pró-inflamatórias em sinergismo com receptores tipo NOD ativados pelos receptores que reconhecem padrões de patógenos (PAMP's), por exemplo, predispõe estes pacientes a infecções bacterianas que prolongam ainda mais os danos inflamatórios do epitélio esofágico.

Os eosinófilos podem contribuir para a inflamação por meio de geração “de novo” e liberação de mediadores lipídicos (Dennis e Norris, 2015 e Gleich, 2000). Nossa hipótese é que estes mediadores poderiam ser estimulados e contribuir para aumentar a resposta inflamatória no esôfago de pacientes portadores de EoE. A síntese de eicosanóides é catalisada pela lipoxigenases e cyclooxygenases (Wymann e Schneider, 2008). No entanto, a expressão de cyclooxygenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX) em eosinófilos na EoE é desconhecida.

O remodelamento na esofagite eosinofílica

O processo de remodelamento do esôfago na EoE ainda não está completamente esclarecido, mas envolve a presença de fibrose na lâmina própria, sendo a grande responsável pelos sintomas de disfagia e impactação alimentar nos pacientes portadores de EoE. Substâncias pró-inflamatórias (IL-5, IL-13, IL-4, eotaxina-3, periostina e TGF- β) produzidas pelas células epiteliais, mastócitos e eosinófilos são as principais responsáveis por este processo. (Cheng e cols., 2012 b)

Há vários fatores envolvidos na proliferação de fibroblastos e na deposição de colágeno. A PCP liberada pelos eosinófilos, devido ao processo de desgranulação dos mesmos, é um importante mediador inflamatório no processo de fibrose esofágica, nas fibroses retroperitoniais idiopáticas, colangite esclerosante e fibrose pulmonar (Aceves e cols., 2007). A produção de TGF- β

pelos basófilos, mastócitos e eosinófilos, é um agente, profibrótico que é naturalmente encontrado no seu estado inativo. Este estado de latência termina quando este agente se liga a proteases oriundas nos mastócitos, como a quimase e triptase, estimulando os fibroblastos a produzirem grandes quantidades de colágeno no epitélio esofágico (Bochner e Gleich, 2010).

A fibrogênese faz parte do processo natural de correção dos danos epiteliais, no qual há transformação dos fibroblastos quiescentes em miofibroblastos. Estes, por sua vez, têm papel bem definido na síntese, deposição, organização e degradação das proteínas da matriz extracelular incluindo colágeno, fibronectina, periostina e matriz de metaloproteinases. Estes miofibroblastos transformados expressam grandes quantias de vimentina e α -actina. Este fenótipo da musculatura esofágica é um dos grandes responsáveis pelos distúrbios da contração e motilidade do esôfago, sendo a causa do processo de impactação, experimentado pela grande maioria dos pacientes portadores de EoE (Cheng e cols., 2012 a).

TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

O tratamento dos pacientes portadores de EoE baseia-se da tentativa de excluir um ou mais alimentos suspeitos, ou mesmo realizar uma dieta elementar com fórmulas de aminoácidos livres, que é mais acessível na faixa etária pediátrica, uso de IBP por longos períodos, corticóides inalatórios utilizados para tratamento da asma (budesonida e fluticasona) que devem ser ingeridos em altas doses pelos pacientes. Nos quadros mais graves, há necessidade de utilização de corticoterapia oral e anticorpos monoclonais anti-IL-5. Para os pacientes com quadro de intensa redução do calibre esofágico, a dilatação do esôfago, procedimento com riscos de perfuração do órgão, precisa ser indicada. Jung e cols. (2011), analisaram retrospectivamente 293 procedimentos de dilatações realizadas em 161 pacientes portadores de EoE e encontraram que a mucosa estava extremamente friável em 27 pacientes (9%), ocorreram três perfurações esofágicas e um caso de hemorragia abundante. Independente de qual tratamento o paciente será exposto, a realização de EDA de repetição com múltiplas biópsias para acompanhamento dos pacientes portadores de EoE a

cada nova etapa de tratamento (uso de corticóide, reintrodução de algum alimento na dieta, etc) torna-se arriscada e com elevado custo financeiro. O tempo para remissão e duração do tratamento ainda é controverso e questiona-se muito, nos casos em que o paciente torna-se assintomático, a manutenção da(s) terapia(s) estabelecida(s), pois até o presente momento não há descrições da evolução da EoE para esôfago de Barret ou mesmo malignidades (Katzka, 2015).

Na prática clínica, além da melhora clínica, somente os parâmetros endoscópicos e a contagem de eosinófilos nas biópsias esofágicas têm sido utilizados para avaliar a gravidade e evolução da doença (Papadoulau, 2014), ou seja, os pacientes necessitam ser submetidos com periodicidade a endoscopias digestivas altas, o que dificulta o acompanhamento da EoE, pois estas são técnicas invasivas, dispendiosas e apresentam grande dificuldade de realização em pacientes pediátricos.

Foi observado que alterações do estado de ativação dos eosinófilos (espraiamento, emissão de pseudópodes, emissão de grânulos de moderada quantidade e presença de vacúolos), por uma técnica de fácil realização utilizando eosinófilos do sangue periférico aderidos à lâmina, relacionavam-se com a gravidade da crise asmática (Marques, 2003; Muniz-Junqueira e cols., 2013). Botan (2010) em um estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, mostrou correlação entre a gravidade clínica e resposta terapêutica de pacientes asmáticos tratados com montelucaste e os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico. Silva-Martins (2013) mostrou que esse teste é fidedigno para acompanhar a resposta ao tratamento com corticoide de crianças asmáticas. Esta técnica é de simples realização, rápida e de baixo custo.

Recentemente tem sido proposto que a deposição de grânulos proteicos da peroxidase derivada dos eosinófilos (EPO) está mais relacionada com a intensidade dos achados clínicos do que propriamente o número de eosinófilos, indicando que a atividade eosinofílica, e, portanto, seu estado de ativação, está intimamente associada a sintomatologia e qualidade de vida destes pacientes (Abonia e cols.; 2010).

Diversos autores (Aceves, 2014; Liacouras e cols., 2011 e Blanchard e cols., 2011) têm buscado por marcadores biológicos do sangue periférico que

possam auxiliar na avaliação destes pacientes, principalmente na faixa etária pediátrica, uma vez que o monitoramento dos pacientes com EoE depende de procedimentos caros e invasivos. Rodríguez-Sánchez e cols. (2013), reforçam que por muitos anos, numerosos estudos têm valorizado o encontro de marcadores de atividade para EoE que possam auxiliar no acompanhamento desta doença sem necessidade de biópsias esofágicas. Damask (2015) questiona a possibilidade de futuros estudos para detectar métodos não endoscópicos para o monitoramento dos pacientes com EoE. Em uma revisão na base científica Pubmed, (Simon e cols., 2015) dentre os marcadores estudados encontra-se principalmente o número de eosinófilos no sangue periférico, mas não há nenhum artigo que analise os parâmetros de ativação destas células em pacientes portadores de EoE. Assim, testes utilizando sangue periférico, capazes de triar pacientes com maior risco de EoE e/ou monitorar a eficácia do tratamento estabelecido estão sendo procurados pela comunidade científica.

O teste que avalia os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico, já demonstrou ser um bom marcador, principalmente nos períodos de crise e intercrise da asma, para definir a gravidade da doença, como também no período intercrise, como um marcador da doença. Se for possível criarmos padrões para diferenciar pacientes sintomáticos doentes (portadores de EoE) com não doentes, teremos uma menor necessidade de realização dos exames endoscópicos com biópsias no acompanhamento desta doença.

JUSTIFICATIVA

Já tem sido demonstrada a relevante participação dos eosinófilos na EoE. Os testes diagnósticos atualmente disponíveis são invasivos e de custo elevado. O número de eosinófilos do sangue periférico nem sempre tem relação com a gravidade da doença, mas o estado de ativação destas células nas biópsias esofágicas tem demonstrado relação com a atividade da doença.

Em paralelo, na asma, tem sido demonstrado que o número de eosinófilos do sangue periférico não tem relação com a gravidade da doença, mas a caracterização do seu estado de ativação mostrou associação com a gravidade da doença. O teste que caracterizou o estado de ativação dos eosinófilos é simples, não invasivo e de baixo custo (Marques, 2003; Botan, 2010; Silva-Martins, 2013; Muniz-Junqueira e cols, 2013).

Se for possível verificar que este teste tem também possibilidade de contribuir para a definição diagnóstica de pacientes com EoE, ele poderia ser utilizado para triagem diagnóstica dos pacientes portadores de EoE, particularmente para seleção de pacientes para indicação de endoscopia digestiva, e se esse teste mostrar relação com a clínica e grau de evolução da esofagite eosinofílica ter-se-á um método fácil e exeqüível para um melhor acompanhamento da evolução clínica e terapêutica destes pacientes.

Portanto, nossa hipótese é que é possível que a avaliação do estado de ativação dos eosinófilos possa contribuir para triagem dos pacientes portadores de EoE que necessitem realizar endoscopia digestiva alta. Caso este teste seja possível, ter-se-á um método rápido, de baixo custo, não invasivo que facilitará o acompanhamento dos pacientes portadores de EoE, principalmente na faixa etária pediátrica.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar se o estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico avaliado por parâmetros morfológicos quantitativos contribui para definição diagnóstica dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica.

Objetivos específicos

1. Avaliar os alérgenos mais frequentemente relacionados com a EoE no nosso meio.
2. Relacionar a gravidade clínica com o nível de eosinófilos do sangue periférico e IgE total destes pacientes.
3. Avaliar se a influência sobre os parâmetros clínicos e endoscópicos está relacionada com o grau de ativação dos eosinófilos do sangue periférico.
4. Avaliar a expressão da ciclooxigenase e lipooxigenase nos eosinófilos do sangue periférico dos pacientes portadores de EoE.
5. Avaliar se os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico têm capacidade de diferenciar pacientes portadores ou não de EoE.

GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS

1. DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS

Este é um estudo transversal no qual foram avaliados os estados de ativações dos eosinófilos e sua correlação clínica, endoscópica e microscópica em 32 pacientes portadores de esofagite eosinofílica (EoE) e 10 indivíduos controles sadios. O estado de ativação dos eosinófilos foi analisado por parâmetros morfológicos após aderência da célula à lâmina. Os critérios clínicos foram avaliados e classificados segundo sintomatologia dos pacientes, testes alérgicos e laboratoriais no dia da coleta de sangue. Os critérios endoscópicos foram obtidos das endoscopias digestivas alta (EDA) realizadas nestes pacientes após 8 semanas de tratamento com inibidores de bomba de prótons (IBP) e os critérios microscópicos foram oriundos das lâminas obtidas da biópsia no dia da EDA.

O diagrama do estudo encontra-se descritos na **Figura 1**.

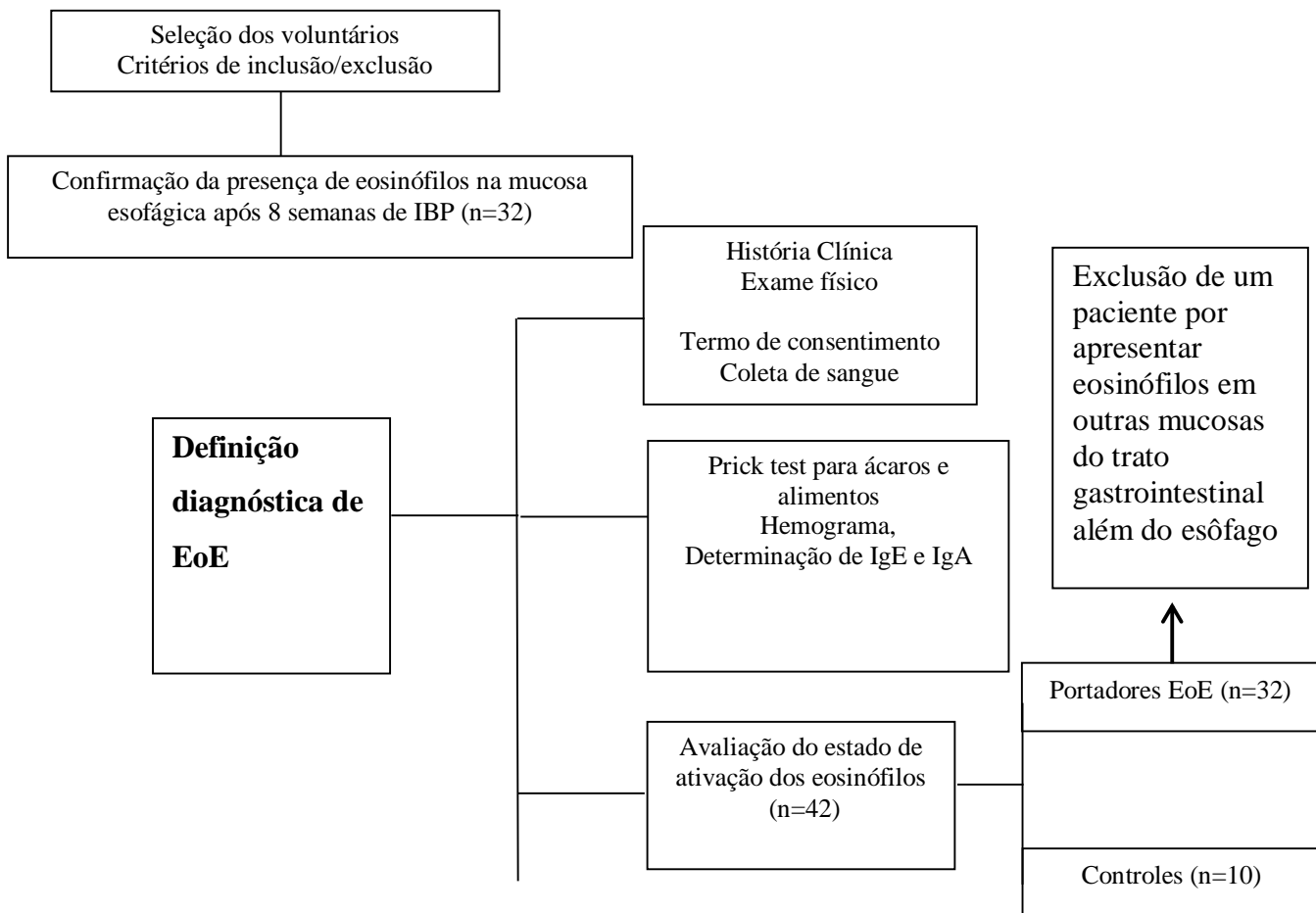


Figura 1: Diagrama geral do estudo. A seta indica a exclusão um indivíduo portador de EoE, mas que apresentou também infiltrados eosinofílicos no íleo e duodeno.

2. GRUPOS DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

As normas éticas para pesquisa científica em seres humanos, estabelecidas pela Declaração de Helsinki atualizada (2013) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro (MS, 1996) foram rigorosamente observadas durante todo o desenvolvimento do presente trabalho. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília pela Plataforma Brasil (**Anexo 1**). O projeto encontra-se dentro do grupo de risco mínimo, tendo sido realizada a coleta de 10 ml de sangue de cada indivíduo por punção venosa periférica, com material estéril e descartável, após o termo de consentimento livre e após esclarecimento escrito (**Anexos 2, 3 e 4**) ter sido assinado pelos pacientes para pacientes maiores de 18 anos, ou pais ou responsáveis para pacientes menores de 18 anos. O termo de aceite para participar do estudo foi assinado também pelos pacientes menores de 18 anos (**Anexo 5**). Todos os procedimentos relacionados à biópsia de esôfago que foram realizadas pelos pacientes foram feitas por indicação e como parte de sua avaliação e tratamento clínico regular.

O desenho experimental do trabalho e sua condução deveram-se exclusivamente aos autores que não apresentam nenhum conflito de interesse.

Foram selecionados inicialmente 32 pacientes portadores de eosofagite eosinofílica, de ambos os sexos, adultos e crianças oriundos da clínica ALERGYA, sob responsabilidade técnica da Dra. Valéria Botan (CRM 15145), situada SGAS 910 bloco E - Edifício Mix Park Sul, Brasília - DF. Todos estes pacientes foram encaminhados por gastroenterologistas e alergistas procedentes da cidade de Brasília.

Na avaliação clínica, todos os pacientes com EoE trouxeram exame endoscópico com biópsia de esôfago que comprovava o diagnóstico de EoE e já haviam sido submetidos ao tratamento por pelo menos 8 semanas com inibidores de bomba de prótons (IBP) e continuavam apresentando na biópsia a presença de igual ou maior que 15 eosinófilos por campo de grande aumento (Papadopoulou e cols., Management Guidelines ESPGHAN 2014). Este critério foi fundamental para excluir a eosinofilia esofágica respondedora a IBP.

Durante consulta, foi preenchido o protocolo clínico de pesquisa (**Anexo 6**) e assinado termo de consentimento livre e esclarecido. Após a concordância

pelo paciente, foi retirada uma amostra de 10 ml sangue venoso para realização de hemograma, dosagem total de IgE e IgA e avaliação do estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico. Todos os pacientes já haviam realizado a segunda EDA com biópsia compatível com EoE, em vigência de IBP.

Nos pacientes e controles selecionados realizou-se o teste de puntura (prick test) de leitura imediata, fazendo-se inoculação dos alérgenos nos antebraços direito e esquerdo, com leitura após 15 minutos, utilizando-se conjuntos de puntores plásticos para cada indivíduo e num mesmo paciente puntores diferentes para cada alérgeno (Carvalho e cols., 2001). Todos os extratos alergênicos tiveram a mesma procedência (FDA Allergenic®), padronizados em Ube (unidade biológica equivalente). Foram utilizados dezesseis alérgenos diferentes sendo quatro aeroalérgenos e doze alérgenos alimentares. Os alérgenos testados foram: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, Fungos mix (*Alternaria sp*, *Cladosporum sp* e *Aspergillus sp*), leite de vaca, alfa lactoalbumina, betalactoglobulina, caseína, ovo de galinha, trigo, soja, camarão, amendoim, carne bovina, leite *in natura* e soja *in natura*. Em todos os pacientes foi realizado controle positivo com cloridrato de histamina e controle negativo com solução salina. O resultado foi considerado como positivo quando após a aplicação do alérgeno ocorria a apresentação de pápula maior do que 3 mm em relação ao controle negativo e reatividade presente no local de inoculação da histamina. A leitura dos testes foi sempre realizada por único examinador para evitar viés de aferição. Todos os pacientes foram orientados a não utilizar nenhum anti-histamínico sete dias antes do teste.

O hemograma foi realizado por método automatizado e as dosagens de IgE e IgA foi feita pelo método da nefelometria, e o resultado expresso em mg/dL.

2.1. Avaliação clínica inicial dos indivíduos

Crianças, adolescentes e adultos portadores de EoE que preencheram os critérios de diagnóstico, segundo Dellon e cols. (2013), foram avaliados pelo Protocolo Clínico de Pesquisa (**Anexo 6**) que incluía: a) dados de identificação; b) critérios de inclusão; c) critérios de exclusão; d) formas clínicas associadas e

seu respectivo tratamento: asma, rinite alérgica, conjuntivite alérgica e dermatite atópica; e) fatores de risco para desenvolvimento de EoE; f) data de início dos sintomas; g) data da primeira endoscopia digestiva alta (EDA) com presença de igual ou maior do que 15 eosinófilos/campo em grande aumento; h) presença de sintomas clínicos referentes aos critérios clínicos para definição diagnóstica de EoE: vômitos, regurgitação, dor abdominal, dor epigástrica, pirose, dor torácica, engasgos durante a refeição, necessidade de ingestão de líquidos durante alimentação, disfagia, baixo ou perda de ganho ponderal, impactação alimentar e necessidade de idas ao pronto-socorro devido impactação alimentar; i) critérios endoscópicos: edema da mucosa, palidez da mucosa, presença de anéis concêntricos, exsudato ou pontilhado esbranquiçado, presença de estrias longitudinais, diminuição do diâmetro esofágico e fragilidade da mucosa (aspecto papel crepom); j) critérios microscópicos: número de eosinófilos/campo de grande aumento, microabscessos eosinofílicos, estratificação superficial dos eosinófilos, hiperplasia das células basais, fibrose da lâmina própria e a presença de outras células como linfócitos, monócitos, basófilos, etc; l) tipo de tratamento realizado pelo paciente no momento da consulta: dieta elementar, dieta de exclusão de algum alimento, uso de IBP, corticóide tópico (fluticasona ou budesonida), corticóide oral, montelucaste ou nenhum tratamento.

Após o preenchimento deste protocolo, era realizado o exame físico com ênfase nos sinais clínicos digestivos.

Com fins de propiciar a análise de correlação estatística entre a gravidade da doença com os parâmetros de ativação dos eosinófilos, foi definida uma pontuação para gravidade, onde se atribui valores aos diversos parâmetros clínicos apresentados pelos pacientes, segundo a frequência dos sintomas e baseado nas diretrizes clínicas para o diagnóstico e manejo da EoE e Eosinofilia (Dellon e cols; 2013) (**Tabela 01**). Segundo essa padronização, a pontuação mínima é 0 e a máxima 49 pontos. Foi considerado para nosso estudo que os pacientes eram portadores de sintomas leves quando escore variou entre 0 a 12 pontos, sintomas moderados entre 13 a 19 e graves entre 20 - 49 pontos.

Tabela 01: Escore clínico para determinação do grau de sintomas apresentados pelos pacientes portadores de EoE.

SINTOMAS	PONTUAÇÃO				
	0	1	2	3	4
	Nenhum	Ocasional	Mensal	Semanal	Diários
Vômitos	0	1	2	3	4
Regurgitação	0	1	2	3	4
Dor abdominal	0	1	2	3	4
Dor epigástrica	0	1	2	3	4
Pirose - queimação	0	1	2	3	4
Dor torácica	0	1	2	3	4
Disfagia	0	1	2	3	4
Engasgos durante refeição	0	1	2	3	4
Necessidade de ingestão de líquido para alimentar-se	0	1	2	3	4
Disfagia	Nenhuma 0	Sólidos 1	Pastoso 2	Líquido 3	Saliva 4
Baixo ganho ponderal Ou perda ponderal	Ausente 0	Presente 1			
Impactação do alimento	Ausente 0	Presente 4			
Ida ao PS para EDA devido impactação alimentar	Ausente 0	Presente 4			

PS= Serviço de pronto atendimento médico. EDA= endoscopia digestiva alta

Adaptado de Dellon e cols. (2013) e Papadopoulou e cols. (2014).

2.2 Critérios endoscópicos

Para classificação dos critérios endoscópicos também foi criado um escore baseado na gravidade dos achados da endoscopia digestiva alta (Dellon e cols.; 2013 e Papadopoulou e cols.; 2014). Foram avaliados os seguintes sinais: presença de edema (diminuição das marcas vasculares ou palidez da mucosa; presença de anéis vasculares, processo denominado de traqueização esofágica que pode variar de um quadro leve até a ausência da passagem do aparelho endoscópico; exsudato pontilhado esbranquiçado (leve < 10% da área esofágica e grave (>10% da área esofágica); presença de estrias verticais; constrição com

diminuição do calibre esofágico e fragilidade da mucosa, processo conhecido como “aspecto de papel crepom”. Foram considerados para esse trabalho, quadros leves aqueles cuja pontuação foi 1, os quais apresentavam somente edema da mucosa; moderados, de 2 a 3 pontos, nos quais se encontravam estrias verticais e pontilhados esbranquiçados; e grave, quando acima de 3 pontos, e foram considerados achados endoscópicos graves a presença de mais do que 10% de exsudato esbranquiçado, sulcos profundos, anéis concêntricos e diminuição do calibre da mucosa (**Tabela 02**).

Tabela 02: Escore dos critérios endoscópicos visualizados durante a EDA dos pacientes portadores de EoE.

Edema (diminuição das marcas vasculares ou palidez mucosa)	Anéis concêntricos (traqueização)	Exsudato Pontilhado esbranquiçado	Estrias verticais	Constricção (Diminuição do diâmetro)	Papel crepom Fragilidade mucosa
Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0
Presente 1	Leve 1	Leve (> 10% da área esofágica) 1	Presente 1	Presente 1	Presente 1
	Moderada (não impede passagem do endoscópio) 2	Grave (<10% da área esofágica) 2			
	Grave (ausência da passagem do endoscópio) 3				
Endoscopia normal () Pontuação total: _____					

Adaptado de Dellon e cols. (2013) e Papadopoulou e cols. (2014).

2.3. Critérios microscópicos das biópsias esofágicas

Foram considerados para o estudo dados microscópicos dos achados da biópsia diagnóstica os seguintes critérios: número de eosinófilos por campo de grande aumento; formação de microabscessos eosinofílicos, estratificação superficial de eosinófilos, hiperplasia das células basais, fibrose da lâmina própria com deposição de colágeno e presença de outras células inflamatórias como monócitos, basófilos, linfócitos e neutrófilos.

Uma das limitações de nosso trabalho, foi o fato de que as análises histopatológicas da biópsia de esôfago ter sido realizada por patologistas diferentes, pois quando incluímos os pacientes no estudo, as biópsias já tinham sido realizadas.

2.4 Critérios de Inclusão dos pacientes portadores de EoE

Foram considerados os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo: a) Crianças, adolescentes ou adultos portadores de esofagite eosinofílica (EoE), com biópsia compatível apresentando 15 ou mais eosinófilos/campo de grande aumento, encaminhados de serviços de Gastroenterologia e/ou Alergia da cidade de Brasília; b) Persistência de 15 ou mais eosinófilos/campo de grande aumento, durante a segunda EDA com biópsia, em uso de 8 semanas de IBP; c) Concordância dos pais, responsáveis ou do próprio paciente nos casos de maior idade (18 anos) em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.5 Critérios de Exclusão dos pacientes portadores de EoE

Os critérios de exclusão do estudo incluíram doenças que poderiam causar eosinofilia esofágica como: Neoplasias; Síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; Doenças de depósitos ou Erros inatos do metabolismo; Doenças da Tireóide; Doença Celíaca; Doenças auto-imunes (ARJ, LES, Dermatomiosite, Vasculites.); Acalasia; Pênfigo; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Hipo/Agamaglobulinemia; Doença de Crohn; Uso de terapêutica com droga imunossupressora; Reação de hipersensibilidade a drogas, parasitoses intestinais e não concordância do paciente, dos pais ou responsáveis em

participar da pesquisa.

2.6. Critérios de Inclusão dos indivíduos controles

Para termos de comparação do estado de ativação dos eosinófilos com os valores normais foram estudados dez indivíduos que não apresentavam doença alérgica. Estas foram selecionadas nos ambulatórios de Gastroenterologia e Alergia Geral do Distrito Federal e encaminhados para a coleta de 10 ml de sangue no laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Antes da coleta, era explicada a finalidade da pesquisa e preenchido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para controles sadios. As mesmas contra-indicações para o dia da coleta dos pacientes portadores de EoE foram utilizadas para o grupo controle.

Os critérios para inclusão dos controles sadios foram: a) Crianças, adolescentes ou adultos que realizaram endoscopia digestiva alta devido a sintomas gastrointestinais, entretanto que não apresentavam biópsia compatível com 15 ou mais eosinófilos/campo de grande aumento; b) Crianças, adolescentes ou adultos sem história de asma ou rinite persistente, dermatites atópicas ou conjuntivites alérgicas; c) Concordância dos pais, responsáveis ou do próprio paciente nos casos de maior idade (18 anos) em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.7. Contra-indicações gerais para coleta de sangue

Após a análise clínica e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os pacientes e controles eram encaminhadas para a coleta de sangue. As contra-indicações gerais para o dia da coleta foram as seguintes: a) processo infeccioso agudo febril, b) vigência de crise asmática/alérgica, c) uso de corticóide oral nos últimos quinze dias, d) uso de hemoderivados nos últimos trinta dias, e) vacinação nos últimos quinze dias.

3. AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS NOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES SADIOS.

Foram estudados dois grupos de crianças, adolescentes e adultos com idade entre 2 a 52 anos no Ambulatório de Alergia e Imunologia da Clínica ALERGYA. Destes, foi coletado sangue para avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos, que se realizou no Laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Os grupos estudados foram assim distribuídos:

Grupo 1 (n=32): Crianças, adolescentes e adultos portadores de esofagite eosinofílica não responsivos ao tratamento com inibidores de bomba de prótons, oriundos de ambulatórios de gastroenterologia e/ou alergia do Distrito Federal;

Grupo 2 (n=10): Crianças, adolescentes e adultos que haviam realizado endoscopia digestiva alta, devido sintomas digestivos leves sem evidência de eosinófilos na mucosa esofágica, oriundos de ambulatórios de gastroenterologia e/ou alergia do Distrito Federal. O perfil destes pacientes encontra-se no **Anexo 7** e dos pacientes controles no **Anexo 8**.

Em todas as amostras foram caracterizados os aspectos morfológicos dos eosinófilos obtidos pela aderência à lâmina de microscopia.

Foram coletado de 10 ml de sangue venoso periférico de todos indivíduos estudados, dos quais 40µl foram distribuídos em escavações previamente delimitadas em áreas de 7mm de diâmetro marcadas com epóxi em lâminas de microscopia, para avaliação da ativação dos eosinófilos.

As preparações foram incubadas em câmara úmida a 37°C, por 45 minutos, para permitir a aderência dos fagócitos à lâmina. Em seguida, as células não aderentes (eritrócitos, plaquetas e linfócitos) foram retiradas por lavagem com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, a 37°C. A monocamada de células aderentes (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) foi fixada com metanol por 2 minutos e corada com Giemsa a 10% em tampão para coloração pH 6,8, pois neste pH os eosinófilos ficam mais bem caracterizados, com grânulos de coloração alaranjada (Marques, 2003).

O estado de ativação dos eosinófilos foi avaliado por parâmetros

morfológicos em 200 eosinófilos por preparação. A análise foi feita ao microscópio óptico, com aumento de 1000X, em imersão, quantificando-se os seguintes parâmetros: eosinófilo normal, espriamento, arredondamento, emissão de grânulos (pequena, moderada e acentuada quantidade), presença de vacúolos, presença de pseudópodes (localizados e generalizados), presença de grânulos isolados, aspectos de degeneração celular e contato entre eosinófilos e outras células (Botan, 2010; Muniz-Junqueira e cols., 2013)

4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CICLOXIGENASE-2 E 5-LIPOXIGENASE NOS EOSINÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO DOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

Para analisar a expressão de cicloxigenase-2 e 5-lipoxigenase, eosinófilos do sangue periférico de dois pacientes portadores de EoE e um controle foram avaliados em duplicata por microscopia de imunofluorescência. As células foram obtidas a partir do creme leucocitário, após centrifugação do sangue total coletado em heparina. A viabilidade foi avaliada com nigrosina à 0,5% e foi sempre superior a 98%. Após quantificação em hemocítmetro para uma proporção de 10^6 células/200 μ L de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), pH 7,2, a 4°C, estéril, suplementado com HEPES 20mM (Sigma), 2,5mg/dl de gentamicina. As células foram colocadas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça, Europa) sobre lamínulas de vidro redondas de 13 mm para possibilitar a aderência dos leucócitos. Os leucócitos foram incubados durante 2 horas em câmara úmida, a 37°C, em 5% de CO². Em seguida, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 à 37°C (STF) e as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4%.

Para realizar a marcação do COX-2 e do LOX-5, o paraformaldeído foi retirado por lavagem com STF e depois as membranas dos leucócitos foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma) a 0,2% em STF durante 30 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com soro albumina bovina a 2% em STF durante 20 min. As células foram então incubadas durante 24 h à temperatura ambiente, com anticorpos policlonais IgG de coelho anti-COX-2

(SC-1746, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, EUA) ou com anticorpos policlonais IgG de coelho anti-LOX-5 (SC-8885, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Após um novo passo de lavagem, as células foram tratadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa 488 (Southern Biotech) durante 1h, à temperatura ambiente. As células foram então tratadas com DAPI diluído 1/5000 em STF durante 5 min e as lamínulas foram montadas sobre uma lâmina com meio de montagem *antifading* (Prolong Ouro, Invitrogen Eugene, OR, EUA). Como controle das ligações não específicas do anticorpo secundário, foi incluído nas marcações duas lamínulas de cada indivíduo contendo células incubadas somente com o anticorpo secundário.

As imagens fluorescentes foram capturadas em um microscópio Zeiss LSM 800 e processadas com o programa Zen 2 versão 2.0 (Carl Zeiss Microscopia GmbH, Jena, Alemanha). Para quantificar a expressão de COX-2 e 5-LOX nos eosinófilos foi utilizado o programa ImageJ 1.47q (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) utilizando o método de análise adaptado de Noursadeghi e cols (2014). Para tal, vinte campos contendo eosinófilos foram selecionados em cada duplicata de cada indivíduo estudado e também nas lâminas controle. Em cada imagem, a intensidade de fluorescência média (IFM) de COX-2 e 5-LOX foi obtida a partir da análise dos citoplasma dos eosinófilos. Para se obter a expressão de COX-2 e 5-LOX final, o valor médio da IFM dos controles foi subtraída do valor médio da IFM das lâminas testes. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência média (IFM) por vinte células.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises e os gráficos foram feitos empregando-se o programa Prism® 5 para Windows (GraphPad, USA, 2007) e SigmaStat 3.11/SigmaPlot 9.01 para Windows.

Previamente aos experimentos foi feito o teste para determinação do tamanho da amostra para obter resultados estatísticos confiáveis utilizando o programa estatístico SigmaStat 3.11/SigmaPlot 9.01 para Windows, sendo

determinado que seria suficiente um n de 30 indivíduos, considerando como parâmetros uma diferença entre as médias de 20, o desvio padrão da amostra de 20, o poder do teste 0,8-0,9 e o valor do $p < 0,05$.

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis das amostras. A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado ou o de Mann-Whitney. Os testes estatísticos empregados para a comparação entre mais do que 2 grupos foram o ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para as múltiplas comparações entre os grupos, respectivamente, segundo a normalidade das amostras.

Para comparação entre proporções foram utilizados os teste do qui-quadrado ou de Fisher.

Para avaliar as correlações entre os dados foram utilizados o teste de correlação de Pearson para amostras com distribuição normal e o teste de correlação de Spearman para amostras com distribuição não normal.

A sensibilidade foi classicamente calculada pelo número de positivos verdadeiros dividido pelo número de positivos verdadeiros somado ao número de falsos negativos multiplicado por 100.

Sensibilidade = $(\text{número de positivos verdadeiros} / \text{número de positivos verdadeiros} + \text{número de falsos negativos}) \times 100$.

Especificidade = $(\text{número de negativos verdadeiros} / \text{número de negativos verdadeiros} + \text{número de falsos positivos}) \times 100$.

Valor preditivo positivo = $(\text{número de positivos verdadeiros} / \text{número de positivos verdadeiros} + \text{número de falsos positivos}) \times 100$.

Valor preditivo negativo = $(\text{número de negativos verdadeiros} / \text{número de negativos verdadeiros} + \text{número de falsos negativos}) \times 100$

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados foram expressos, graficamente, como mediana, quartis e extremos.

RESULTADOS

1. PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES

Os grupos controles e portadores de EoE foram caracterizados segundo os parâmetros clínicos e laboratoriais abaixo descritos.

Foram incluídas na pesquisa 31 pacientes portadores de EoE, sendo crianças, adolescentes e adultos, com idade que variaram de 2 a 52 anos, com média±DP de 20 anos e 3 meses±13,5. Quinze pacientes (46,8%) eram crianças e adolescentes na faixa etária de 2 a 15 anos de idade e 16 pacientes (53,2%) apresentavam idade entre 21 e 52 anos. Observamos predomínio do gênero masculino entre os pacientes portadores de EoE, sendo que 23 pacientes (72%) eram do sexo masculino (**Figura 03**).

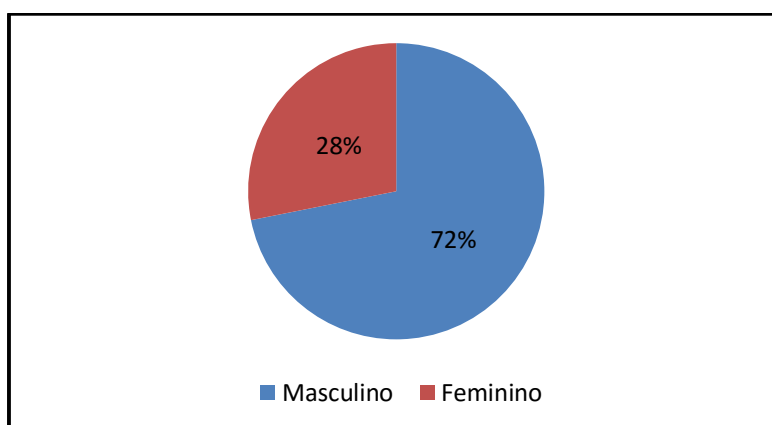


Figura 03: Distribuição dos pacientes com EoE (n=31) segundo o gênero.

No grupo controle foram incluídos 10 pacientes portadores de sintomas digestivos leves, que foram submetidos à endoscopia por indicação de seu médico acompanhante e que não apresentavam eosinófilos no exame histopatológico do esôfago, os quais não preenchem os critérios para diagnóstico de EoE. A idade dos indivíduos do grupo controle variou de 7 a 42 anos com média±DP de 28 anos e 8 meses ± 9,5. Setenta por cento (7/10) dos controles eram do sexo masculino. Não houve diferença estatística entre os grupos de indivíduos com EoE e controle em relação à idade ($p=0,07$; teste t) e ao gênero ($p=1,00$; Teste Exato de Fisher).

Entre os parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de EoE e do grupo controle, observou-se que o valor médio da hemoglobina para o grupo controle foi $14,86 \pm 0,27$ g/dl e para os portadores de EoE, o valor médio foi de $15,01 \pm 1,47$ g/dl ($p= 0,75$; teste t). Nenhum paciente apresentava anemia no momento da coleta sanguínea para análise dos dados.

Pela análise dos leucócitos, observou-se que os valores encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade para o grupo controle, variando de 7000 céls/mm³ a 10500 céls/mm³, com média±DP de 8590 ± 881 céls/mm³. No grupo de pacientes portadores de EoE, os leucócitos variaram de 5100 céls/mm³ a 21500 céls/mm³ com média±DP de 8658 ± 3439 céls/mm³, sendo que não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,16$; teste de Mann Whitney). Entre os pacientes com EoE, o número total de leucócitos estava acima de 12.000/mm³ em apenas três indivíduos.

A mediana do número de eosinófilos no sangue periférico encontrava-se elevada nos pacientes portadores de EoE (400 eosinófilos/mm³), encontrando-se dentro dos parâmetros de normalidade para o grupo controle, sendo a mediana para esse grupo de 65 eosinófilos/mm³ ($p<0,0001$; Mann Whitney). **(Figura 04)**. Embora os pacientes com EoE tenham apresentado valores significativamente maiores do que os indivíduos normais, em 4 indivíduos (13%), esses valores encontravam-se dentro da normalidade para a faixa etária, sendo que destes, três pacientes mantinham uso de IBP.

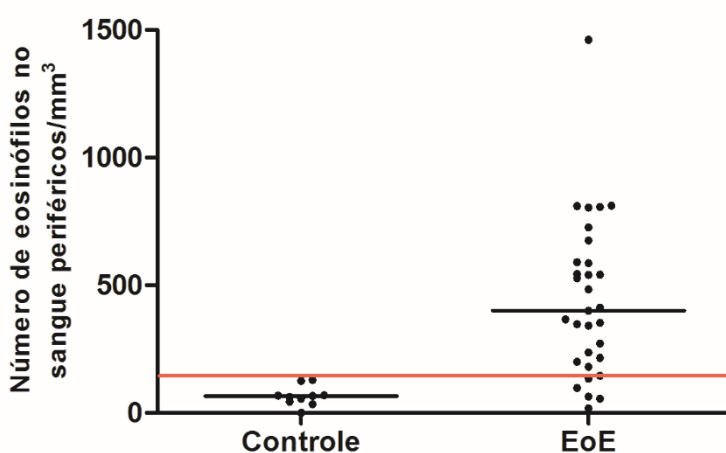


Figura 04: Número de eosinófilos no sangue periférico de pacientes com EoE (n=31) e controles (n=10). Os dados individuais estão representados e a mediana identificada ($p < 0,0001$, teste de Mann-Whitney).

A mediana dos níveis séricos de imunoglobulina A (IgA) para os pacientes com EoE (132mg/dl) foi significativamente menor do que a mediana dos indivíduos controles (245mg/dl) ($p = 0,0043$; Mann Whitney). Três pacientes do sexo masculino portadores de EoE apresentavam deficiência parcial de IgA, segundo níveis séricos de imunoglobulina A para população brasileira (Fujimura, 1991). Um adulto de 31 anos apresentou IgA de 26,9mg/dl (faixa de normalidade entre 84mg/dl e 354mg/dl). Na faixa pediátrica os valores variam com a idade. Uma criança de 9 anos apresentou IgA de 44mg/dl (normal para faixa etária de 70 a 311 mg/dl) e outra criança de 10 anos apresentou IgA de 46,9 (normal para faixa etária é 113 a 248mg/dl) (**Figura 05**).

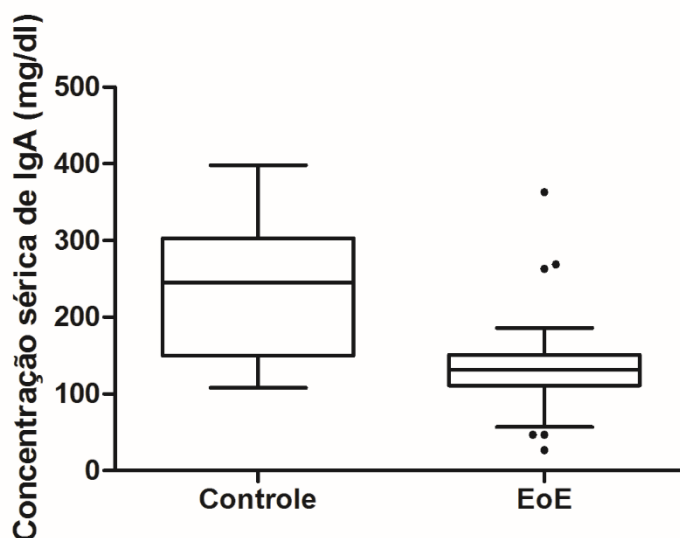


Figura 05: Concentração sérica de imunoglobulinas A (IgA) em pacientes com EoE. Os dados estão representados como mediana, quartis e valores extremos. Os valores *outliers* estão apontados ($p < 0,004$, teste de Mann-Whitney).

Não houve diferença estatística na concentração sérica da IgE quando comparamos os grupos controle e EoE ($p = 0,37$; Mann Whitney). Sendo que a

mediana do grupo controle foi de 67,75 mg/dl e dos portadores de EoE foi de 81mg/dl. O valor de referência para normalidade na determinação de IgE sérico pelo teste realizado variou conforme a idade, segundo referências do aparelho e técnica utilizada. No grupo controle, dois pacientes adultos (20%) apresentavam IgE com valores acima de 140mg/dl e nos portadores de EoE, 17/31 (54,8%) apresentaram valores acima do padrão normal ($p=0,05$, Qui quadrado).

Observamos que a correlação, embora fraca, foi estatisticamente significativa entre a concentração sérica de IgE e o número de eosinófilos no sangue periférico para os indivíduos portadores de EoE ($p=0,04$; $r^S=0,36$, teste de correlação de Spearman). Não houve correlação entre esses parâmetros para os indivíduos do grupo controle ($p=0,26$, teste de correlação de Spearman) (**Figura 06**).

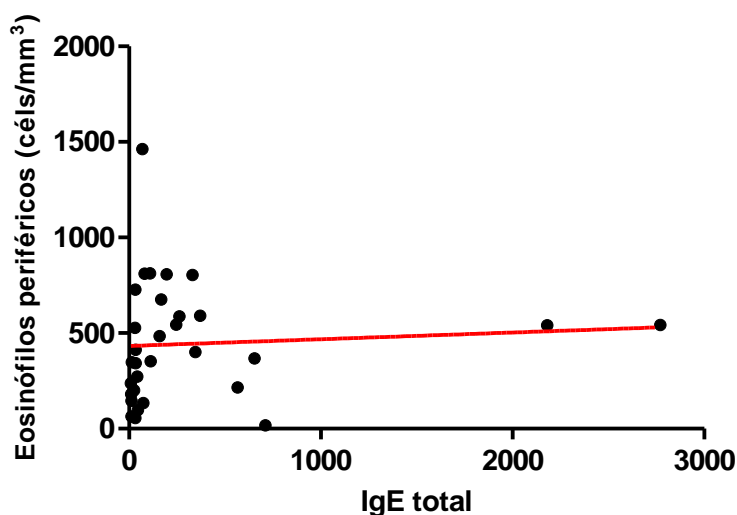


Figura 06: Correlação entre a concentração sérica de IgE e o número de eosinófilos no sangue periférico de indivíduos com EoE. ($p=0,04$; $r^S=0,36$, teste de correlação de Spearman).

1.1 ASSOCIAÇÕES COM OUTRAS ATOPIAS

Do total dos 31 pacientes analisados, treze (42%) não apresentavam nenhuma outra atopia e dezoito (58%) possuíam outras atopias associadas, sendo a rinite alérgica e a asma as associações mais frequentes (**Figura 07**).

Nove pacientes eram portadores de asma ou tinham histórico de crises na infância (28%) e 56% dos pacientes tinham algum sintoma de rinite alérgica. Vale ressaltar que nenhum paciente asmático realizava tratamento profilático, nem havia ingerido corticóides orais quatro semanas antes do estudo e não apresentava asma isolada, estando sempre associada com rinite alérgica. Dois pacientes portadores de rinite alérgica faziam uso de corticóide tópico nasal e dois pacientes estavam em imunoterapia antiácara há poucas semanas (fase indução inicial). Dez por cento dos pacientes (n=3/31) apresentavam conjuntivite alérgica e 6% (n=2/31) tinham sintomas de dermatite atópica.

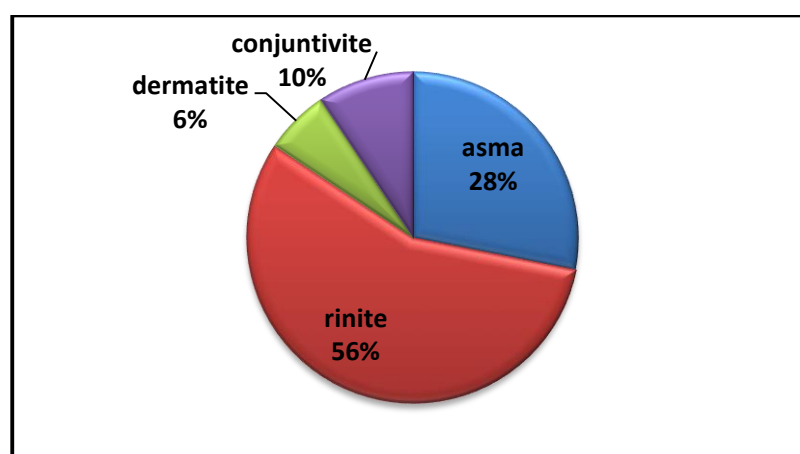


Figura 07: Frequência da associação da EoE com outras doenças alérgicas nos pacientes portadores de esofagite eosinofílica.

1.2 FATORES DE RISCO E TEMPO DE DEMORA ATÉ O DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO

Dentre os fatores de risco nos pacientes portadores de EoE, oitenta por cento dos pacientes (n=25) apresentavam histórico familiar para alguma atopia entre parentes próximos (pais e irmãos) e doze pacientes (38%) faziam uso recorrente de inibidores de bomba de prótons (IBP), sem prescrição médica devido dores epigástricas ou abdominais.

O tempo médio entre o início dos sintomas e a realização da endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsia positiva para o diagnóstico de EoE variou de 1 mês até 20 anos, com mediana de 3 anos e 6 meses. Dentre os adolescentes e adultos, cinco já apresentavam sintomas desde infância, sendo que em três

pacientes (10%) foram realizados tratamentos psiquiátricos e/ou investigações cardiológicas extensas na busca de isquemia miocárdica. Uma criança do sexo feminino apresentava sintomas e pHmetria positiva para doença do refluxo gastroesofágico, desde 6 meses de vida, e o diagnóstico de EoE foi feito aos 2 anos de idade após realização da EDA. Somente em um paciente adulto, o diagnóstico foi feito ocasionalmente, em consequência de uma endoscopia digestiva que foi realizada preventivamente devido ao pai ter falecido de câncer gástrico, embora o indivíduo estivesse assintomático.

1.3 ESCORE CLÍNICO DOS PACIENTES PORTADORES DE EOE E CONTROLES

Nas **tabelas 03** e **04** estão descritos, em valores absolutos e percentuais, os sintomas apresentados pelos adultos e crianças portadoras de EoE, respectivamente. Vale ressaltar que no grupo controle, somente dois pacientes relataram dores abdominais ocasionais, sem apresentar nenhum outro sintoma clínico associado, não preenchendo nenhuma pontuação no escore.

Tabela 03: Sintomas apresentados pelos pacientes adultos portadores de EoE antes do diagnóstico pela realização da EDA (n= 16).

Sintomas	Ocasional	Mensal	Semanal	Diários	Total
Vômitos	n=2 (12,5%)				n=2 (12,5%)
Regurgitação		n=1 (6,25%)	n=2 (12,5%)		n=3 (18,75%)
Dor abdominal	n=3 (18,75%)	n=2 (12,5%)	n=4(25%)	n=3 (18,75%)	n=12 (75%)
Dor epigástrica	n=4(25%)		n=4(25%)	n=4(25%)	n=12 (75%)
Pirose - queimação	n=1 (6,25%)		n=6 (37,5%)	n=6 (37,5%)	n=13 (81,25%)
Dor torácica	n=2 (12,5%)	n=1 (6,25%)	n=3 (18,75%)	n=3 (18,75%)	n=9 (56,25%)
Engasgos durante Refeição	n=1 (6,25%)		n=1 (6,25%)	n=3 (18,75%)	n=4(25%)
Necessidade de ingestão de líquido para conseguir alimentar-se	n=1 (6,25%)			n=6 (37,5%)	n=7 (43,75%)
Disfagia	Sólidos n=8 (50%)	Pastoso n=1 (6,25%)	Líquido n=1 (6,25%)	Saliva	n=9 (56,25%)
Baixo ganho ponderal Ou perda ponderal	n=3 (18,75%)				n=3 (18,75%)
Impactação alimentar	n=8 (50%)				n=8 (50%)
Ida ao PS para EDA devido impactação Alimentar	n=5 (31,25%)				n=5 (31,25%)

Entre os pacientes adultos (n=16), os sintomas mais prevalentes foram pirose (81,25%), dores abdominais (50%), dor epigástrica (50%), dor torácica (56,25%), disfagia para sólidos (50%) e impactação alimentar (50%). É importante ressaltar que cinco pacientes (31,25%) necessitaram ir a um serviço de emergência para realizar EDA devido quadro de impactação de algum alimento. Três pacientes devido a um pedaço de carne, um paciente engasgou com sushi e uma paciente com banana.

Tabela 04: Sintomas apresentados pelas crianças e adolescentes portadores de EoE (n=15) antes do diagnóstico pela realização da EDA.

Sintomas	Ocasional	Mensal	Semanal	Diários	Total
Vômitos	n=3 (20%)	n=2 (13,3%)	n=1(6,6%)	n=8 (53,3%)	n=14 (93,3%)
Regurgitação	n=3 (20%)		n=1(6,6%)	n=9 (60%)	n=12 (80%)
Dor abdominal	n=3 (20%)	n=1(6,6%)	n=2 (13,3%)	n=3 (20%)	n=9 (60%)
Dor epigástrica			n=3 (20%)	n=4 (26,6%)	n=7 (46,6%)
Pirose - queimação	n=3 (20%)	n=1(6,6%)	n=3 (20%)	n=1(6,6%)	n=8 (53,3%)
Dor torácica		n=1(6,6%)	n=2 (13,3%)		n=3 (20%)
Engasgos durante Refeição	n=2 (13,3%)	n=1(6,6%)	n=2 (13,3%)	n=2 (13,3%)	n=7 (22,5%)
Necessidade de ingesta durante alimentação				n=4(26,6%)	n=4(26,6%)
Disfagia	Sólidos n=9 (60%)	Pastoso n=1(6,6%)	Líquido	Saliva	n=10 (66,6%)
Baixo ganho ponderal ou perda ponderal	n=8 (53,3%)				n=8 (53,3%)
Impactação alimentar	n=3 (20%)				n=3 (20%)
Ida ao PS para EDA devido impactação Alimentar	n=1(6,6%)				n=1(6,6%)

Os sintomas mais predominantes na infância e adolescência, foram vômitos (93,3%), regurgitação (80%), dor abdominal (60%) e dificuldade de ganho ponderal em mais de 50% das crianças e adolescentes. Este último sintoma clínico, foi apenas relatado pelos responsáveis dos pacientes, pois nenhuma criança apresentava índice de massa corporal (IMC) baixo para faixa etária analisada. Além disso, 60% das crianças e adolescentes já apresentavam queixa de disfagia para alimentos sólidos.

Pela comparação dos sintomas apresentados entre

crianças/adolescentes e adultos portadores de EoE observou-se predominância nas crianças de vômitos ($p < 0,0001$; Teste Exato de Fisher), regurgitação ($p = 0,001$; Teste Exato de Fisher) e dificuldade ou baixo ganho ponderal ($p = 0,004$; Teste Qui-Quadrado) quando comparado aos pacientes adultos. A referência de dor torácica foi mais frequente nos pacientes adultos ($p = 0,001$; Teste Exato de Fisher) (**Tabela 05**).

Tabela 05: Análise estatística dos sintomas apresentados por crianças/adolescentes e adultos durante avaliação clínica.

Sintomas	Crianças/Adolescentes (n=15)	Adultos (n=16)	p	Teste
Vômitos	14 (93,3%)	2 (12,5%)	$p < 0,0001$	Teste Exato de Fisher
Regurgitação	12 (80%)	3 (18,75%)	$p = 0,001$	
Dor abdominal	9 (60%)	12 (75%)	$p = 0,45$	
Dor epigástrica	7 (46,6%)	12 (75%)	$p = 0,14$	
Pirose	8 (53,3%)	13 (81,25%)	$p = 0,13$	
Dor torácica	3 (20%)	9 (56,25%)	$p = 0,001$	
Engasgos durante refeição	7 (46,6%)	4 (25%)	$p = 0,27$	
Necessidade de ingestão de líquido durante alimentação	4 (26,6%)	7 (43,75%)	$p = 0,45$	
Disfagia	10 (66,6%)	9 (56,25%)	$p = 0,71$	
Baixo ganho ponderal ou perda ponderal	8 (53,3%)	3 (18,75%)	$p = 0,04$	Teste Qui-Quadrado
Impactação alimentar	3 (20%)	8 (50%)	$p = 0,08$	
Ida ao PS para EDA devido impactação alimentar	1 (6,66%)	5 (31,25%)	$p = 0,08$	

Houve diminuição no escore clínico dos sintomas dos pacientes portadores de EoE após o tratamento com IBP ($p = 0,002$; teste t pareado) (**Figura 08**). Nos pacientes portadores de EoE, o escore clínico variou de 4 a 26 pontos

com mediana de 11 pontos. Após tratamento com IBP o escore clínico variou de zero a 23 pontos, com mediana de 7 pontos. Todos os pacientes foram submetidos ao tratamento com IBP para excluir a possibilidade de eosinofilia esofágica respondedora a IBP. Observou-se que em 21 pacientes (67,7%) houve redução do escore de sintomas clínicos após o tratamento com IBP ($p=0,002$; teste t pareado).

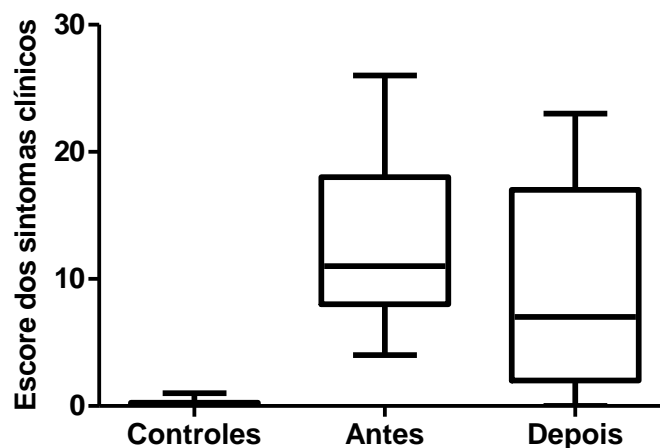


Figura 08: Comparação entre os controles e os pacientes portadores de EoE antes e após tratamento com IBP ($p<0,0001$; Teste de Kruskal- Wallis, seguido pelo Teste de Múltiplas Comparações de Dunns). Na análise dos pacientes somente antes e após o tratamento com IBP, houve diminuição dos sintomas, estatisticamente significativa ($p=0,002$; teste t pareado).

Não houve correlação entre o escore clínico dos sintomas apresentados pelos pacientes portadores de EoE antes da realização da EDA e o níveis séricos de IgE total e IgA, ($p= 0,92$; $r^s=0,01$ e $p=0,73$; $r^s=0,07$, respectivamente). Também não houve correlação entre o escore clínico dos pacientes já submetidos ao tratamento com IBP e os níveis séricos de IgE total e IgA ($p=0,80$; $r^s= -0,04$ e $p=0,76$; $r^s= -0,06$, respectivamente).

Também não houve diferença entre o escore clínico dos pacientes portadores de EoE associado às demais atopias: grupos EoE comparados com pacientes asmáticos e com rinite (EoE+A+R) e nem com os pacientes portadores de EoE com somente rinite associada (EoE+R). Somente a diferença entre os controles e os pacientes portadores de EoE e os paciente com EoE mais asma e rinite associada foi significativa estatisticamente ($p<0,0001$; Kruskal- Wallis

seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns) (**Figura 09**). Não foram analisados os dados referentes aos pacientes que apresentavam conjuntivite e dermatite atópica associadas devido à baixa frequência de pacientes portadores destas atopias.

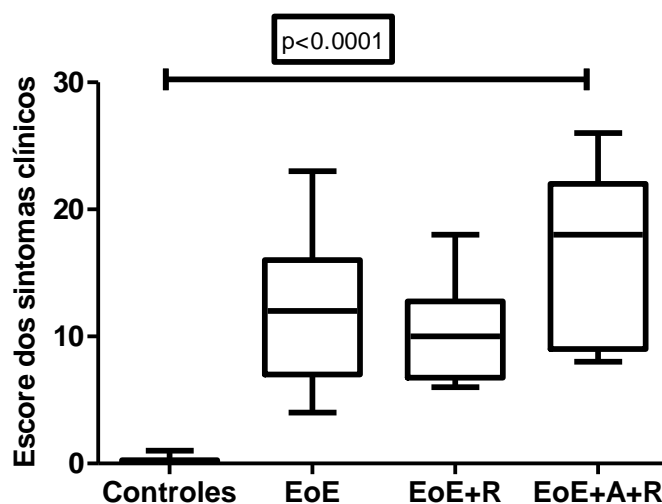


Figura 09: Comparação do grupo controle com os pacientes somente portadores de EoE ($p < 0,0001$; Mann-Whitney) e entre os pacientes portadores de EoE com rinite (EoE+R) e EoE com asma e rinite (EoE+A+R). A diferença estatística somente foi significativa entre o grupo controle comparado com os pacientes EoE+A+R ($p < 0,0001$ Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn).

Na análise do escore clínico inicial que os pacientes portadores de EoE apresentavam e a relação com história familiar de atopia, não se observou diferença entre pacientes com sintomas leves (escore até 12) e sintomas moderados ou graves (escore de 13 a 43 pontos) ($p = 0,65$; Teste Exato de Fisher).

Utilizou-se o mesmo escore para sintomas leves ou moderados/graves, observou-se que o uso frequente de IBP, sem indicação médica, não foi fator de risco para EoE ($p = 0,45$; Teste Exato de Fisher) (**Figura 10**).

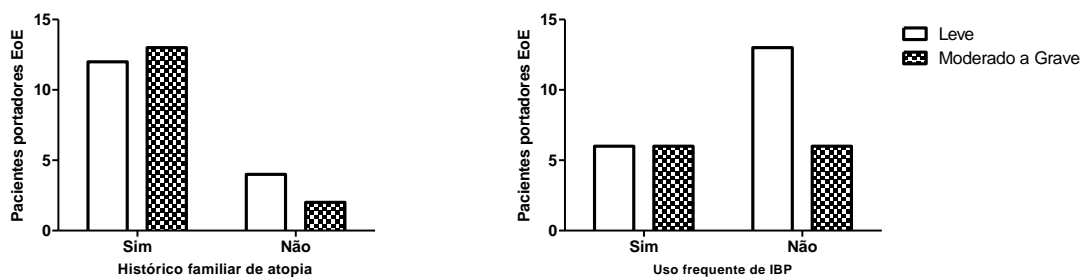


Figura 10: Comparação do escore dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes portadores de EoE, divididos em sintomas leves (escore até 12 pontos) e sintomas moderados a grave (escore 13 a 43 pontos), com a presença do fator de risco de história familiar de atopia ($p=0,65$; Teste Exato de Fisher) e o uso frequente de IBP ($p=0,45$; Teste Exato de Fisher).

ANÁLISE DO TESTE DE PUNTURA COM LEITURA IMEDIATA (PRICK TEST) DOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE EOE

Foram realizados 41 testes de puntura com leitura imediata (prick test PT) para os alérgenos previamente citados na metodologia. Destes, 10 indivíduos eram controles e somente um paciente apresentou teste positivo para ácaros da poeira doméstica (*Derm pt* = 9mm; *Derm far*=7mm e *Blomia*=5mm) embora não apresentasse clínica para alergias respiratórias. Dentre os 31 pacientes portadores de EoE, doze pacientes (39%) não reagiram para nenhum alérgeno testado, seja aeroalérgenos ou alérgenos alimentares e 61% ($n=19/31$) reagiram à pelo menos um dos dezesseis alérgenos testados.

Dentre os dezenove pacientes reatores, 84% ($n=16/19$) reagiram a pelo menos um dos três ácaros da poeira doméstica testado e nenhum reagiu aos fungos. Quinze pacientes reagiram a algum alimento, sendo o amendoim ($n=5/18\%$), leite de vaca ($n=2/7\%$) e ovo ($n=2/7\%$) os alimentos mais comuns que causaram pápulas de tamanho superior a 3 mm (**Figura 11**). Dos 16 pacientes que reagiram a algum aeroalérgeno, treze (81%) possuíam alguma história de asma ou rinite alérgica também associada. A tabela com os resultados dos tamanhos das pápulas expressos em mm de todos pacientes portadores de EoE encontra-se no **Anexo 09**.

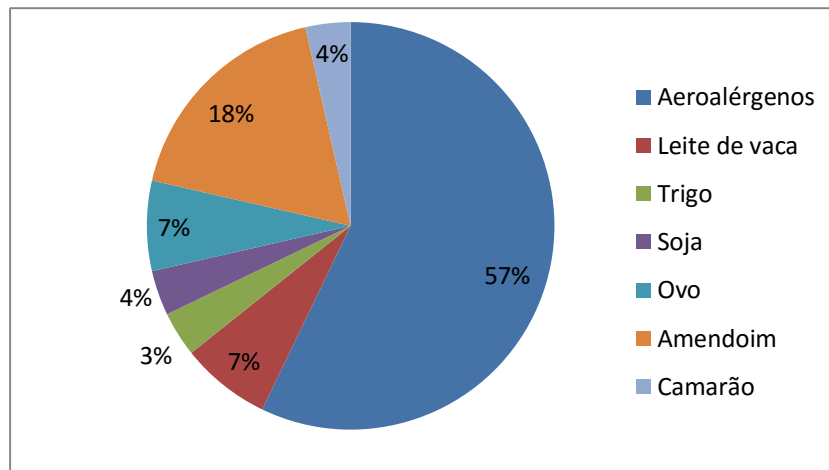


Figura 11: Valores em percentuais dos alérgenos que apresentaram pápula maior do que 3 mm nos pacientes portadores de EoE.

PARÂMETROS ENDOSCÓPICOS DOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA E CONTROLES.

Os escores endoscópicos variaram de zero pontos (EDA normal) a 8 pontos, com mediana de 3 pontos. Conforme descrito na metodologia, separamos os parâmetros endoscópicos dos pacientes em normal, leve, moderado e grave para análise. Nenhum paciente controle, que realizou EDA apresentou alterações compatíveis com achados de EoE ou mesmo de esofagite erosiva (EE). Dezesesseis por cento (5/31) dos pacientes com EoE apresentavam endoscopia normal; quinze pacientes (48%; 15/31) apresentavam alterações moderadas e onze pacientes (36%; 11/31) apresentavam alterações graves, inclusive com dificuldade de passagem do endoscópio devido fragilidade da mucosa e/ou estreitamento do esôfago. Dos pacientes que apresentavam alterações no exame endoscópico do esôfago após o tratamento com IBP (26/31), em nenhum deles os achados endoscópicos foram classificados como leves, pois 100% (26/26) dos pacientes apresentavam estrias verticais nas endoscopias controles após uso de IBP por 8 semanas (**Figura 12**).

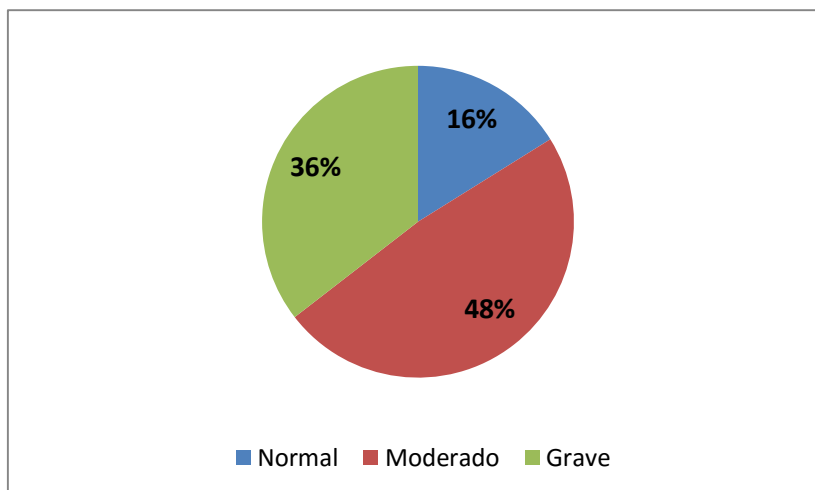


Figura 12: Escore dos achados endoscópicos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica (EoE) à época do diagnóstico.

Não houve correlação entre os escores clínicos antes e após o uso de IBP por 8 semanas e os escores endoscópicos, respectivamente ($p= 0,07$; $r^s= -0,32$ e $p=0,88$; $r_s= -0,03$; teste de correlação de Spearman).

Não houve correlação entre o escore endoscópico apresentado pelos pacientes portadores de EoE e os níveis séricos de IgA, níveis séricos de IgE e número absoluto de eosinófilos periféricos ($p=0,45$; $r^s 0,14$ / $p= 0,48$; $r^s 0,13$ e $p= 0,30$; $r^p 0,18$, respectivamente).

Portanto, pelos nossos dados, não foi possível mostrar correlação entre os parâmetros clínicos, endoscópicos e os valores séricos de IgE e IgA.

PARÂMETROS MICROSCÓPICOS DAS BIÓPSIAS ESOFÁGICAS DOS PACIENTES PORTADORES DE EoE

Nos achados microscópicos resultantes das biópsias esofágicas dos pacientes portadores de EoE foram avaliados o número de eosinófilos por campo de grande aumento (400X) a presença de outras células inflamatórias, formação de microabscessos, estratificação superficial dos eosinófilos, hiperplasia das células basais e presença de fibrose na lâmina própria.

O número de eosinófilos por campo variou de 15 células (valor limite para diagnóstico) a 250 células, com mediana de 55 eosinófilos/campo. Cem por cento dos pacientes (31/31) apresentaram hiperplasia das células basais.

Sete pacientes (7/31; 22,5%) apresentavam fibrose da lâmina própria, porém em 42% (13/31) dos indivíduos negativos para esse parâmetro, não pode ser excluído que a biópsia foi muito superficial, impossibilitando a análise desse parâmetro.

Estratificação superficial dos eosinófilos estavam presentes em 83% dos portadores de EoE (26/31) e a presença de microabscessos eosinofílicos em 42% dos casos (13/31). A presença de outras células inflamatórias foi encontrada em 29% dos casos (9/31), sendo basófilos (5/31), neutrófilos (3/31) e monócitos (3/31). Dois pacientes apresentaram basófilos e monócitos na mesma biópsia (**Figura 13**).

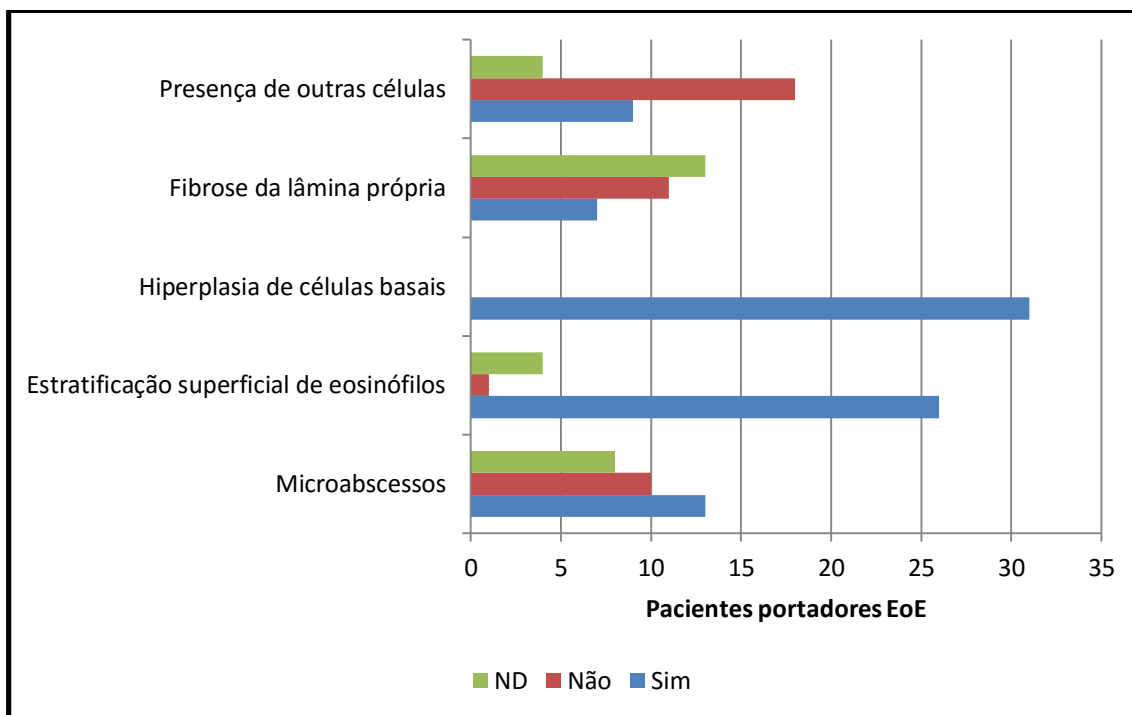


Figura 13: Achados microscópicos encontrados nas biópsias de pacientes portadores de EoE após 8 semanas de uso de IBP. Nota-se que 100% dos pacientes apresentavam hiperplasia das células basais. A interpretação dos dados de fibrose da lâmina própria deve-se feita com cautela, pois pode ser devida apenas ao fato de não existir essa região em todos os cortes histológicos realizados. ND = não descrito.

TRATAMENTO REALIZADO PELOS PACIENTES PORTADORES DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

Dos 31 pacientes portadores de EoE, dezenove (61%) não realizavam nenhum tratamento durante a coleta dos exames. Dos pacientes estudados, 12 (39%) estavam em uso de alguma terapia durante essa avaliação, sendo que nenhum fazia uso de corticóide oral ou tópico e/ou dieta elementar. Todos os doze pacientes (100%) faziam alguma dieta de restrição com retirada empírica de um ou mais dos seguintes alimentos: leite de vaca (8/12), soja (3/12), peixe (3/12), ovo de galinha (3/12), castanhas (2/12) e trigo (2/12). Onze pacientes do grupo tratado (n=12/91,6%) mantinham uso de inibidor de bomba de prótons (IBP) e um paciente fazia uso de antileucotrieno (montelucaste) (**Figura 13**).

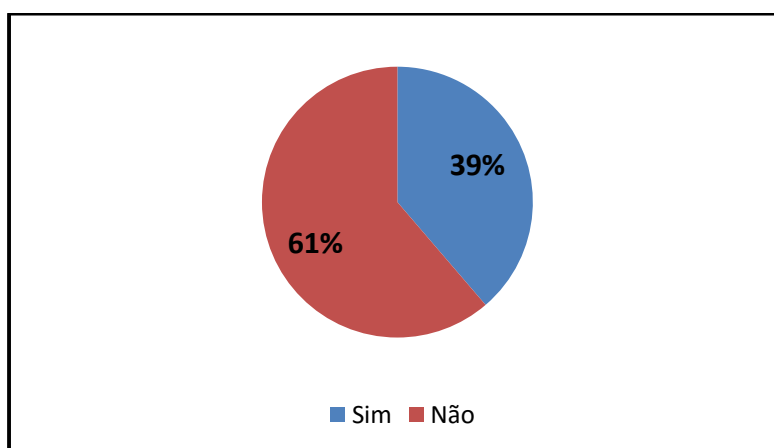


Figura 13: Distribuição dos pacientes portadores de EoE quanto a realização de algum tratamento no dia da avaliação clínica e laboratorial.

Para verificar se o uso de IBP poderia modificar os escores clínicos, foram avaliados os 11 pacientes que continuaram o tratamento com IBP após as 8 semanas necessárias para segunda EDA com biópsia para definição diagnóstica. O mesmo foi feito para os pacientes que descontinuaram a utilização do IBP, após 8 semanas de tratamento. No grupo que continuou tratamento houve diminuição do escore clínico ($p=0,03$; teste t pareado), entretanto o mesmo ocorreu para os pacientes que descontinuaram o uso de IBP no dia da coleta ($p=0,001$; teste de Wilcoxon) (**Figura 14**).

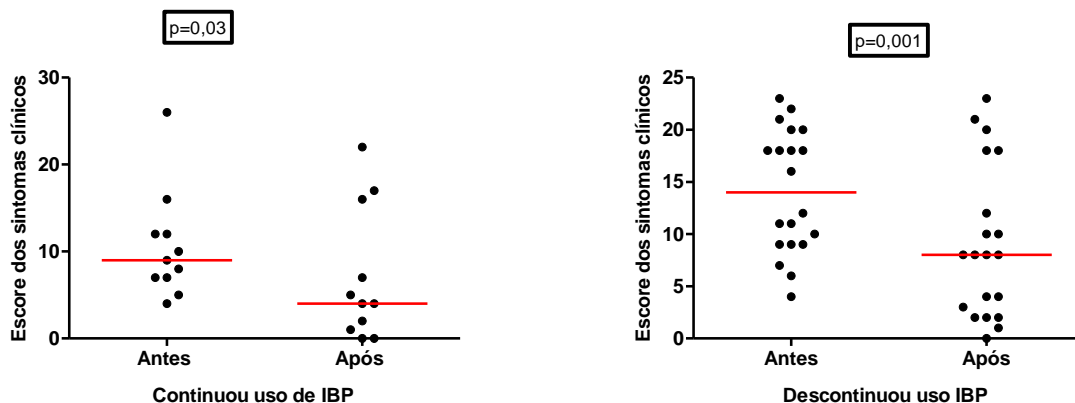


Figura 14: Comparação do escore de sintomas clínicos entre os indivíduos que continuaram ou descontinuaram o uso IBP após a segunda EDA com biópsia até a data da avaliação clínica. Gráfico a esquerda: Escore clínico de sintomas de pacientes que continuaram uso de IBP (11/31) ($p=0,03$; teste t pareado). Gráfico a direita: Escore clínico de sintomas dos pacientes que descontinuaram o uso de IBP (20/31) ($p=0,001$; Teste de Wilcoxon)

Na mesma análise, para avaliar se o tratamento atual com IBP poderia influenciar o escore dos critérios endoscópicos, foram comparados os dois grupos e não se observou diferença estatística entre eles ($p=0,45$; Mann-Whitney). Ao analisar o número de eosinófilos presentes nas biópsias dos pacientes que estavam em uso de IBP até o presente momento da coleta sanguínea com os que apenas haviam utilizado IBP por 8 semanas e interrompido tratamento para nova EDA com biópsia, observou-se que a mediana no número de eosinófilos por campo de grande aumento nos que estavam em uso de IBP foi de 35 eosinófilos/campo, enquanto os que estavam sem tratamento com IBP foi de 63 eosinófilos/campo, entretanto essa diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,10$; Teste de Mann Whitney).

2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DOS EOSINÓFILOS

2.1. Análise comparativa do estado de ativação dos eosinófilos entre os grupos controles e portadores de esofagite eosinofílica.

Pelos parâmetros analisados observamos que os eosinófilos dos pacientes com esofagite eosinofílica encontravam-se significativamente mais ativados do que os eosinófilos dos indivíduos normais.

A mediana do percentual de eosinófilos normais apresentados pelos pacientes portadores de EoE (15%) foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle (60%) ($p < 0,001$; teste de Mann Whitney) (**Figura 15**).

Pela análise do percentual de eosinófilos normais podemos observar que o menor percentual de eosinófilos normais entre os indivíduos controles foi de 40%, enquanto o maior percentual de eosinófilos com aspecto normal entre os pacientes com EoE foi de 32%. Considerando como ponto de corte 36% de eosinófilos normais, observamos que a partir desse valor podemos diferenciar os indivíduos com EoE dos controles não portadores da doença. Ademais, considerando como ponto de corte 36% de eosinófilos normais e o diagnóstico da EoE conforme atualmente definido (Damask, 2015 e Dellon e cols.; 2014) como padrão ouro para o diagnóstico da doença, a sensibilidade do parâmetro porcentagem de eosinófilos normais mostra uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 100% para definição diagnóstica da doença. O Valor Preditivo Positivo foi de 100% e o Valor Preditivo Negativo foi de 0%.

Menor número de eosinófilos em degeneração foi observado nos pacientes com EoE, sendo que a mediana do grupo controle foi de 13% e a dos portadores do EoE foi de 0% ($p = 0,0004$; teste de Mann Whitney).

Para os seguintes parâmetros observamos aumento significativo das medianas dos parâmetros de ativação dos eosinófilos nos pacientes portadores de EoE em relação ao grupo controle: eosinófilos arredondados (8% x 3%, $p = 0,0003$; teste de Mann-Whitney), presença de vacúolos no interior dos eosinófilos (11% x 4%, $p = 0,001$; teste de Mann-Whitney), espraiamento dos

eosinófilos (24% x 5,5%, $p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney), emissão de grânulos em moderada quantidade (7% x 0%, $p = 0,0001$; teste de Mann-Whitney), emissão de grânulos em grande quantidade (4% x 0%, $p = 0,004$; teste de Mann-Whitney), emissão de pseudópodes localizados (10% x 0%, $p < 0,0001$; teste de Mann-Whitney) e presença de grânulos isolados (4% x 0%, $p = 0,004$; teste de Mann-Whitney). Embora, as diferenças foram estatisticamente significantes entre os grupos, não foi possível traçar um ponto de corte para esses parâmetros isoladamente capaz de distinguir totalmente os pacientes com EoE e os controles.

Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os portadores de EoE nos parâmetros emissão de grânulos de pequena quantidade ($p = 0,05$; teste t), presença de pseudópodes generalizados ($p = 0,65$; teste de Mann-Whitney) e contato do eosinófilo com outras células ($p = 0,21$; teste de Mann-Whitney) **(Figura 15)**.

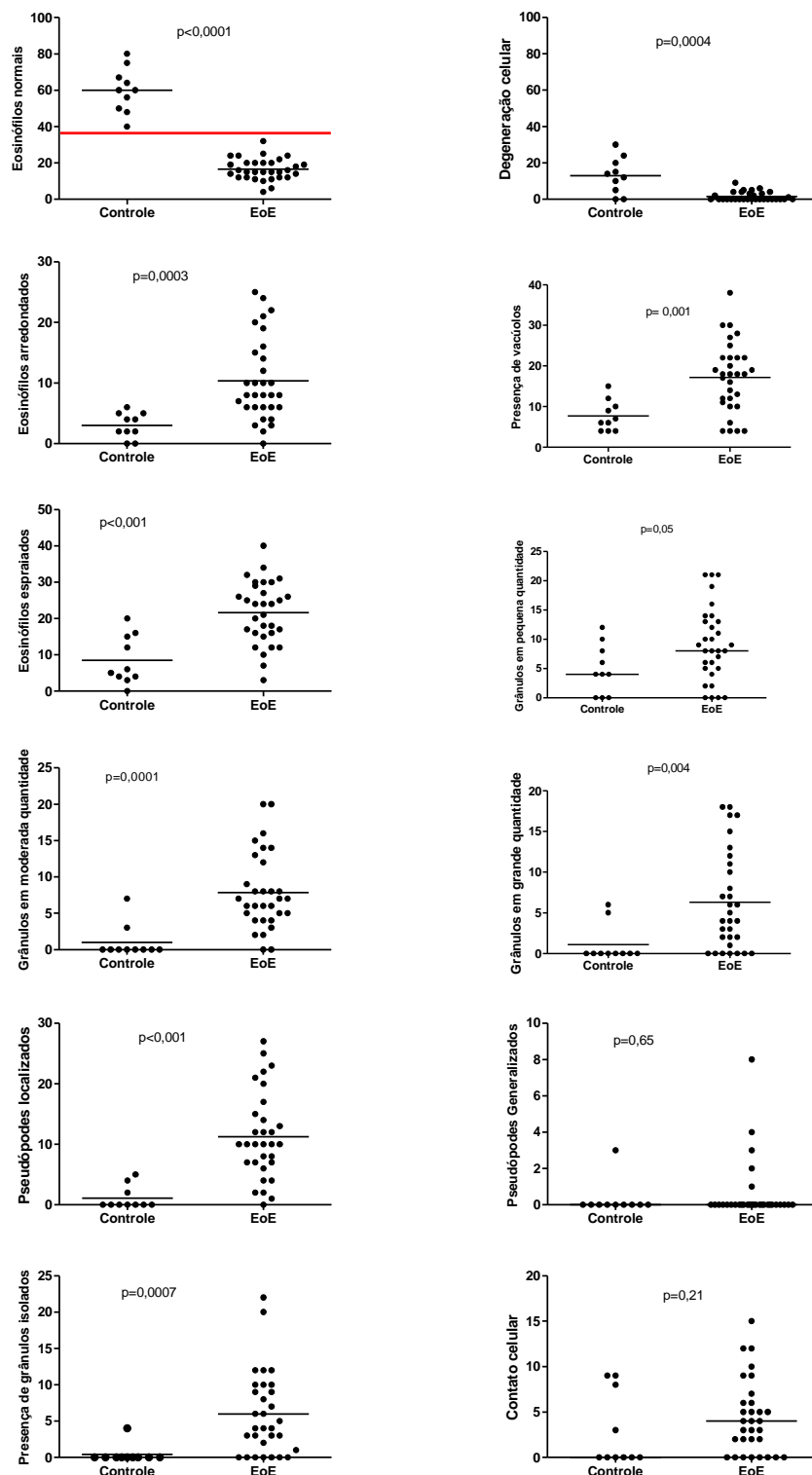


Figura 15: Porcentagem de eosinófilos ativados com alterações morfológicas em pacientes com EoE (n=31) e controles (n=10). Eosinófilos normais (p<0,001; Mann-Whitney); degeneração celular (p=0,0004; Mann-Whitney); eosinófilos arredondados (p=0,0003; Mann-Whitney), emissão de grânulos em moderada quantidade (p=0,001; Mann-Whitney), emissão de grânulos em grande

quantidade ($p=0,04$; Mann-Whitney), presença de grânulos eosinofílicos isolados ($p=0,0007$; Mann-Whitney) e emissão de pseudópodes localizados ($p < 0,001$; Mann-Whitney).

Na **tabela 06** encontram-se descritos os dados comparativos entre os grupos controle e portadores de EoE, para todos os parâmetros de ativação dos eosinófilos.

Tabela 06: Comparação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos com respectivas medianas e p valor. Teste de Mann-Whitney.

Parâmetro de ativação dos eosinófilos	Mediana dos eosinófilos (expressos em %)		p
	Controle	EoE	
Normal	60%	15%	$p < 0,001$
Arredondado	3%	8%	$p=0,0003$
Presença de vacúolos	4%	11%	$p=0,001$
Espraiamento	5,5%	24%	$p < 0,001$
Emissão de grânulos em pequena quantidade	4%	8%	$p=0,05$
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0%	7%	$p=0,0001$
Emissão de grânulos em grande quantidade	0%	4%	$p=0,004$
Pseudópodes localizados	0%	10%	$p < 0,0001$
Pseudópodes generalizados	0%	0%	$p=0,65$
Presença de grânulos isolados	0%	4%	$p=0,0007$
Degeneração celular	13%	0%	$p=0,0004$
Contato celular	0%	4%	$p=0,21$

2.2. Correlação do escore de gravidade clínica dos pacientes portadores de esofagite com os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos.

Realizou-se análise da correlação dos parâmetros de gravidade dos pacientes portadores de EoE com os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos (normal, espraçamento, eosinófilos arredondados, emissão de grânulos em pequena, moderada ou acentuada quantidade, presença de vacúolos, presença de pseudópodes localizados ou generalizados, presença de grânulos isolados, degeneração celular e comunicação celular).

Foram analisados 31 indivíduos portadores de EoE e observou-se correlação direta, estatisticamente significativa, entre a presença de eosinófilos espraçados e escore de gravidade clínica destes pacientes ($p=0,01$; r^p 0,42; Teste de Correlação de Pearson) (**Figura16**).

A presença de eosinófilos normais ($p=0,15$; $r^p = -0,26$; Teste de Correlação de Pearson), eosinófilos arredondados ($p= 0,11$; $r^s=0,28$; Teste de Correlação de Sperman), presença de vacúolos ($p= 0,70$; $r^p=0,07$; Teste de Correlação de Pearson), emissão de grânulos em pequena quantidade ($p=0,05$; $r^p= 0,34$; Teste de Correlação de Pearson), emissão de grânulos em moderada quantidade ($p=0,92$; $r^s=-0,01$; Teste de Correlação de Sperman), emissão de grânulos em grande quantidade ($p=0,75$; $r^s = 0,05$; Teste de Correlação de Sperman), emissão de pseudópodes localizados ($p=0,32$; $r^p=0,18$; Teste de Correlação de Pearson), emissão de pseudópodes generalizados ($p=0,51$; $r^s=-0,12$; Teste de Correlação de Sperman), degeneração celular ($p=0,92$; $r^s -0,01$; Teste de Correlação de Sperman) e contato entre as células ($p=0,55$; $r^p=0,10$; Teste de Correlação de Pearson) não demonstraram significância estatística com o escore clínico dos pacientes portadores de EoE

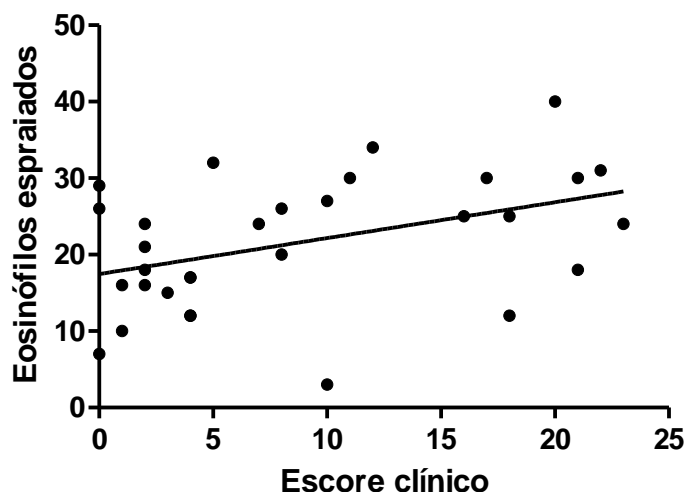


Figura 16: Correlação entre o escore de gravidade clínica e parâmetros de ativação dos eosinófilos espreiados. A porcentagem de eosinófilos espreiados é diretamente proporcional à gravidade clínica ($p=0,01$ e $r^p=0,42$, pelo Teste de Correlação de Pearson).

2.3. Avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos segundo o escore de gravidade clínica dos pacientes com EoE.

Para avaliar se algum dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos possuía relação com a gravidade clínica dos pacientes portadores de EoE foram comparados o grupo controle e os pacientes portadores de EoE com quadro clínico leve (escore de 0 a 12 pontos), moderado (escore de 13 a 19 pontos) ou grave (escore acima de 19 pontos). Nenhum dos parâmetros analisados foi capaz de discriminar a gravidade clínica. Na **tabela 07** encontram-se descritos os parâmetros segundo a gravidade, o teste estatístico realizado e o valor do p . O p valor significativo expressa a diferença entre os pacientes controles e os portadores de EoE, somente (**Figura 17**).

Tabela 07: Comparação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos com escore clínico de gravidade (leve, moderada ou grave) e p valor.

Parâmetro de ativação dos eosinófilos	Medianas dos valor dos eosinófilos (expressa em %)				P valor
	Controle	Leve	Moderado	Grave	
Normal*	60	15,5	14,5	19	p=0,004
Arredondado**	3	6,5	13	12	p=0,0003
Presença de vacúolos*	6,5	17,5	20,5	18	p=0,001
Espraiamento**	5,5	17,5	30	24	p=0,002
Emissão de grânulos em pequena quantidade*	4	6,5	9,5	8	p=0,65
Emissão de grânulos em moderada quantidade**	0	7,5	5,5	7,0	p=0,015
Emissão de grânulos em grande quantidade**	0	5	2,5	5	p=0,02
Pseudópodes localizados**	0	7,5	15,5	10	p=0,0002
Pseudópodes generalizados**	0	0	0	0	p=0,65
Presença de grânulos isolados**	0	5	4	5	p=0,0007
Degeneração celular**	15	1	0	0	p=0,0004
Contato celular*	0	3,5	4	4	p=0,21

* ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keul

** Kruskal- Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn.

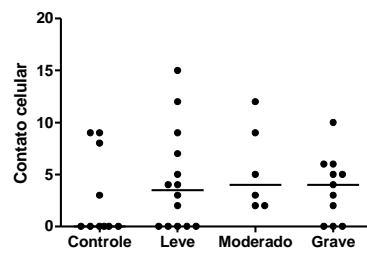
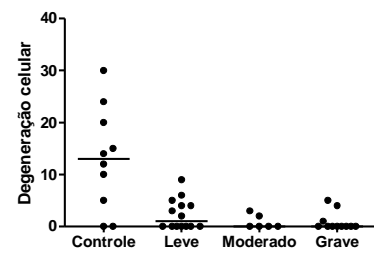
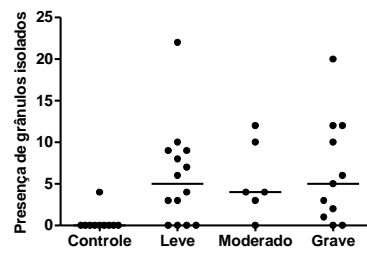
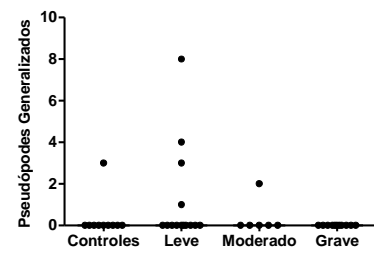
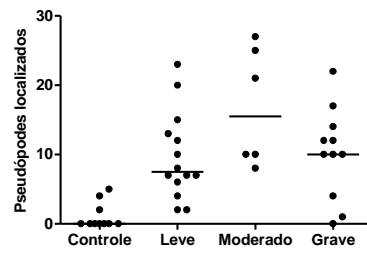
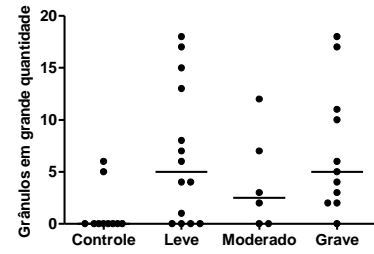
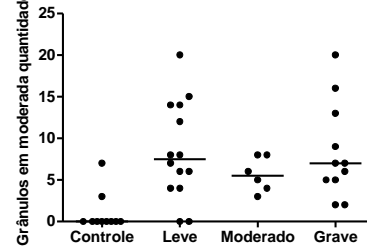
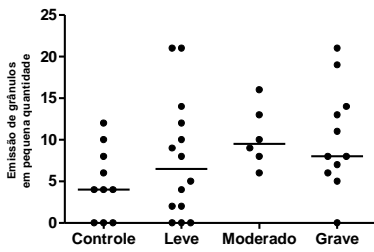
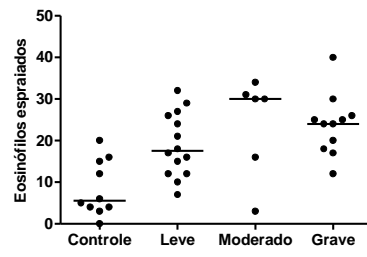
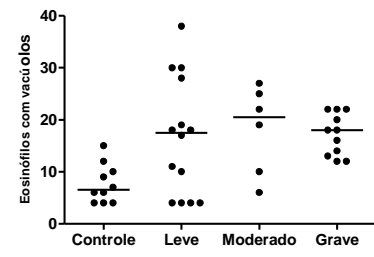
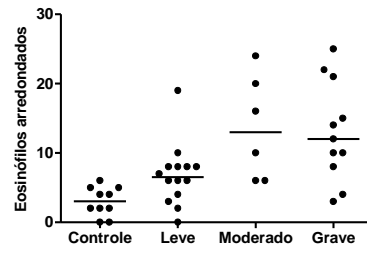
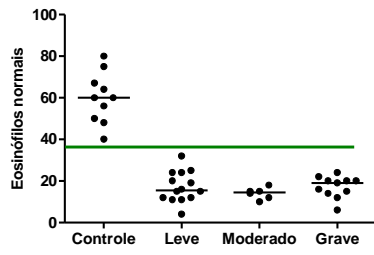


Figura 17: Comparação dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos do sangue periférico entre o grupo controle, pacientes com EoE com escore clínico leve, moderado e grave. Não houve diferença significativa entre os escores de gravidade clínica (leve, moderada e grave).

2.4. Correlação do escore de gravidade clínica dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica com os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos.

Realizou-se análise da correlação dos parâmetros de gravidade dos pacientes portadores de EoE com os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos (normal, espriamento, eosinófilos arredondados, emissão de grânulos em pequena, moderada ou acentuada quantidade, presença de vacúolos, presença de pseudópodes localizados ou generalizados, presença de grânulos isolados, degeneração celular e comunicação celular).

Foram feitos os testes de correlação entre os parâmetros de ativação dos eosinófilos e o escore de gravidade clínica dos pacientes. Observou-se correlação direta, estatisticamente significativa, entre a presença de eosinófilos espriados e o escore de gravidade clínica destes pacientes ($p=0,01$; r^p 0,42; teste de Correlação de Pearson) (**Figura 16**).

A presença de eosinófilos normais ($p=0,15$; $r^p = -0,26$; teste de Correlação de Pearson), eosinófilos arredondados ($p= 0,11$; $r^s=0,28$; teste de correlação de Spearman), presença de vacúolos ($p= 0,70$; $r^p=0,07$; teste de correlação de Pearson), emissão de grânulos em pequena quantidade ($p=0,05$; $r^p= 0,34$; teste de Correlação de Pearson), emissão de grânulos em moderada quantidade ($p=0,92$; $r^s=-0,01$; teste de Correlação de Spearman), emissão de grânulos em grande quantidade ($p=0,75$; $r^s = 0,05$; teste de Correlação de Spearman), emissão de pseudópodes localizados ($p=0,32$; $r^p=0,18$; teste de Correlação de Pearson), emissão de pseudópodes generalizados ($p=0,51$; $r^s=-0,12$; teste de Correlação de Spearman), degeneração celular ($p=0,92$; $r^s -0,01$; teste de Correlação de Spearman) e contato entre as células ($p=0,55$; $r^p=0,10$; teste de Correlação de Pearson) não mostraram correlação estatística com o escore clínico dos pacientes portadores de EoE segundo a gravidade.

2.5 Correlação entre o escore endoscópico dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica e os parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos.

Somente para os parâmetros eosinófilos arredondados ($p=0,04$; $r^s=-0,35$) e espraimento ($p=0,01$ $r^p=-0,41$) mostraram correlação significativa com o escore da endoscopia (**Figura18**).

Os parâmetros eosinófilos normais ($p=0,85$; $r^p=0,03$), presença de vacúolos ($p=0,08$; $r^p=0,31$), emissão de grânulos de pequena quantidade ($p=0,38$; $r^p=0,16$), emissão de grânulos de moderada quantidade ($p=0,96$; $r^s=-0,007$), emissão de grânulos de grande quantidade ($p=0,95$; $r^s=0,009$), presença de pseudópodes localizados ($p=0,82$; $r^p=-0,04$), presença de pseudópodes generalizados ($p=0,64$; $r^s=0,08$), emissão de grânulos isolados ($p=0,50$; $r^p=-0,12$), degeneração celular ($p=0,38$; $r^s=0,16$) e contato celular ($p=0,71$; $r^p=0,06$) não apresentaram correlação com o escore endoscópico apresentado pelos pacientes portadores de EoE.

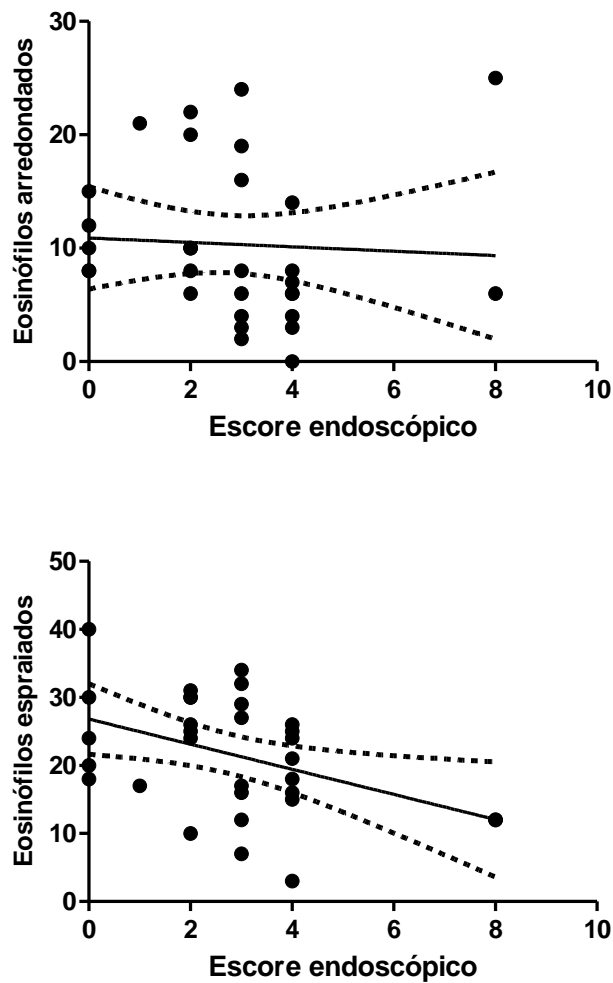


Figura 18: Correlação entre o percentual de eosinófilos arredondados e espalhados e o escore endoscópico. No gráfico superior: O percentual de eosinófilos arredondados foi inversamente proporcional ao escore endoscópico dos pacientes portadores de EoE ($p=0,04$; teste de correlação de Spearman = $-0,35$). No gráfico inferior: Houve correlação inversa entre os eosinófilos espalhados e o escore endoscópico dos pacientes com EoE ($p=0,01$; teste de correlação de Pearson = $-0,41$).

2.6 Avaliação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos segundo escore de gravidade endoscópica dos pacientes portadores de EoE e controles

A gravidade dos achados endoscópicos, segundo escore de gravidade endoscópica, conforme descrito na metodologia, foi avaliada para cada parâmetro morfológico de ativação dos eosinófilos, para verificar se os parâmetros morfológicos apresenta relação ou não com à gravidade observada

ao exame endoscópico.

Ressalta-se que nenhum paciente apresentou alteração leve nos achados endoscópicos (escore de 1 ponto – somente a presença de edema ou palidez da mucosa). As análises a seguir referem-se ao grupo controle, pacientes com EoE com EDA normal (n=5), pacientes com EoE com EDA com escore moderado (n=16) e pacientes com EDA com EDA com escore grave (n=10).

Para o parâmetro porcentagem de eosinófilos arredondados, observou-se que o valor de 6% foi um ponto de corte entre os controles e os indivíduos com EoE, mas apenas para aqueles apresentando as alterações endoscópicas leves. As diferenças foram significantes apenas entre os indivíduos dos grupos: controle x EDA normal e controle X EDA com escore moderado ($p=0,0008$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn). As medianas para os grupos controle, pacientes com EoE e EDA normal, EoE com escore endoscópico moderado e escore grave foram, respectivamente, 3%, 11%, 10% e 6%.

Não foi observada diferença estatística entre os indivíduos sadios e os portadores de EoE com EDA normal ou moderada no parâmetro de ativação com liberação de grânulos em pequena quantidade ($p=0,03$; (ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls). Na emissão de grânulos em moderada quantidade, apesar dos testes apresentarem significância estatística ($p=0,0006$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn) não foi possível discriminar gravidade endoscópica entre os portadores de EoE.

Na emissão de grânulos eosinofílicos em grande quantidade, os pacientes portadores de escore endoscópico grave apresentaram diferença estatisticamente significativa somente com o grupo controle ($p=0,02$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn). Não houve diferença entre os demais grupos. A mediana dos pacientes com escore endoscópico grave foi de 6,5%, moderado 2,5%, com EDA normal 6% e nos sadios de 0%.

Nos seguintes parâmetros morfológicos: presença de grânulos isolados na lâmina ($p=0,004$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, degeneração celular ($p=0,002$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de

múltiplas comparações de Dunn), apresentaram diferença somente quando comparados com grupo controle e EDA de pacientes portadores de EoE. A presença de pseudópodes localizados ($p=0,47$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn) e contato do eosinófilo com outras células ($p=0,56$; Kruskal Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn), não apresentaram significância estatística. Sendo assim, estes parâmetros não avaliaram gravidade endoscópica entre os portadores de EoE. Na **Tabela 08** e a **Figura 19** encontram-se os dados e valores estatísticos dessas análises.

Tabela 08: Escore endoscópico com os parâmetros de ativação dos eosinófilos com respectivas medianas, teste estatístico e p valor (n=31) .

Parâmetro de ativação dos eosinófilos	Mediana dos parâmetros de ativação (expressos em % de eosinófilos)				Teste estatístico	P valor
	Controle	EDA normal	EDA moderada	EDA grave		
Normal	60	17	15,5	17,5	ANOVA	p=0,007
Arredondado	3	11	10	6	Kruskal Wallis	p=0,0008
Presença de vacúolos	6,5	18	12	20	ANOVA	p=0,006
Espraiamento	5,5	22	25,5	17	ANOVA	p=0,0002
Emissão de grânulos em pequena quantidade	5	5,5	8,5	12,5	ANOVA	p=0,03
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0	7	5,5	6,5	Kruskal Wallis	p=0,0006
Emissão de grânulos em grande quantidade	0	6	2,5	6,5	Kruskal Wallis	p=0,02
Pseudópodes localizados	0	11	10	10	Kruskal Wallis	p=0,0006
Pseudópodes generalizados	0	0	0	0	Kruskal Wallis	p=0,47
Presença de grânulos isolados	0	10	3	6	Kruskal Wallis	p=0,004
Degeneração celular	13	0	0	1,5	Kruskal Wallis	p=0,0004
Contato celular	0	4	3,5	3,5	Kruskal Wallis	p=0,56

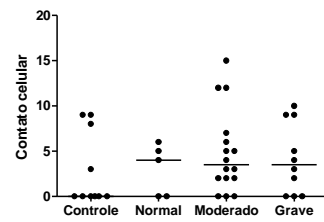
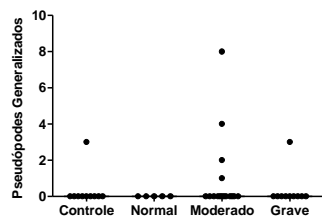
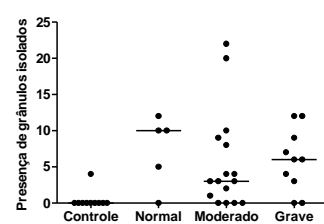
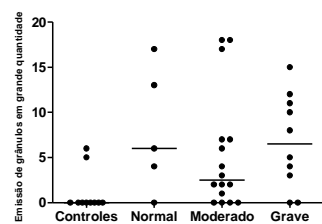
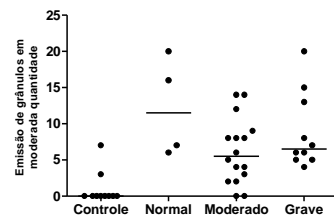
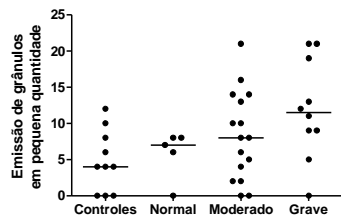
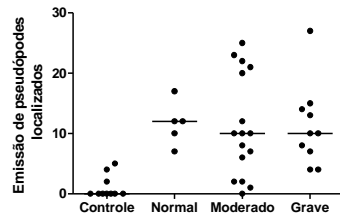
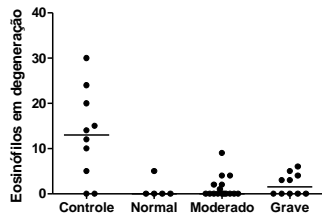
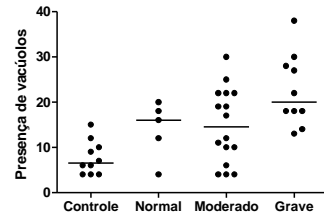
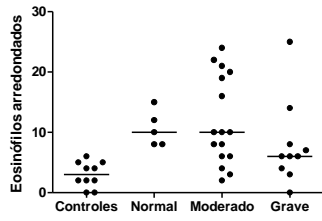
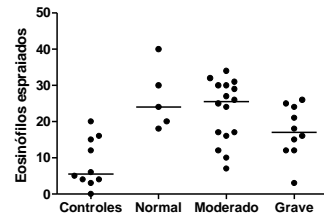
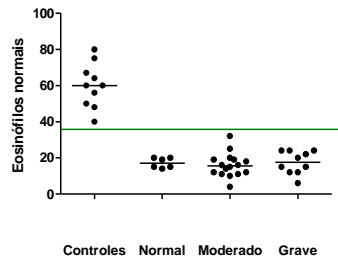


Figura 19: Escore endoscópico (normal, moderado ou grave) em comparação com os diferentes parâmetros de ativação dos eosinófilos.

2.7 Correlação do número de eosinófilos encontrados nas biópsias esofágicas com os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico.

A análise da correlação do número máximo total de eosinófilos encontrados nas biópsias esofágicas comparada com os diferentes parâmetros de ativação dos eosinófilos não mostrou correlação estatística com nenhum parâmetro morfológico (**Tabela 09**).

Tabela 09: Correlação entre o número de eosinófilos encontrados nas biópsias esofágicas e os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico. Teste de correlação de Spearman (n=31).

Parâmetro de ativação dos eosinófilos	P	Teste de correlação de Spearman r^s
Normal	$p= 0,54$	-0,11
Arredondado	$p= 0,24$	-0,21
Presença de vacúolos	$p= 0,60$	-0,09
Espraiamento	$p= 0,31$	-0,18
Emissão de grânulos em pequena quantidade	$p= 0,55$	-0,11
Emissão de grânulos em moderada quantidade	$p= 0,13$	0,27
Emissão de grânulos em grande quantidade	$p= 0,83$	0,03
Pseudópodes localizados	$p= 0,45$	0,13
Pseudópodes generalizados	$p= 0,92$	0,01
Presença de grânulos isolados	$p= 0,52$	0,11
Degeneração celular	$p= 0,59$	0,09
Contato celular	$p= 0,34$	0,17

2.8 Análise dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos entre pacientes sensibilizados e não sensibilizados para os alérgenos testados.

Dos 31 pacientes analisados, doze (38,7%) não apresentavam reação (formação de pápula maior que 3mm em relação ao controle negativo) a nenhum dos dezesseis alérgenos testados. Destes, nove (75%) não possuíam nenhuma outra atopia associada. Dezenove pacientes (61,3%) apresentaram pápula positiva a pelo menos um alérgeno testado (aeroalérgeno ou alimentar), sendo que o histórico pessoal para atopia foi positivo em dezessete pacientes (89,5%), com significância estatística entre os sensibilizados e não sensibilizados ($p=0,0005$, Teste Exato de Fisher) (**Tabela 10**). Na análise do gênero, observa-se menor frequência do sexo feminino dentre os pacientes sensibilizados (3/19 – 15,7%), quando comparado no grupo de pacientes não sensibilizados (5/12 – 41,6%). A idade não influenciou nesta análise, pois praticamente 50% de ambos grupos (sensibilizados ou não) eram crianças ou adolescentes.

Tabela10: Relação entre pacientes sensibilizados (prick teste positivo) e não sensibilizados (prick teste negativo) com histórico pessoal de atopias (n=31).

	Prick test positivo para pelo menos um alérgeno	Prick test negativo para todos alérgenos	P Valor
Sem outras atopias associadas	2	9	p= 0,0005 Teste Exato de Fisher
Com outras atopias associadas	17	3	
Total	19	12	

Na tentativa de avaliar se os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos apresentavam padrões diferentes entre os pacientes sensibilizados e não sensibilizados, realizou-se a análise de cada parâmetros para estes grupos. A avaliação de múltiplos grupos, incluindo controle, portadores EoE não sensibilizados e portadores de EoE sensibilizados não encontrou diferenças significantes entre os grupos de portadores de EoE, ou seja, não demonstrou nenhum padrão mais prevalente em um grupo que em outro (**Tabela 11**). Quando se analisou, somente os pacientes controles com os portadores de EoE

não sensibilizados e controles com portadores de EoE não sensibilizados, observou-se que os mesmos parâmetros morfológicos apresentavam ou não significância estatística, sendo a presença de pseudópodes generalizados, emissão de grânulos em pequena quantidade e contato celular, os três parâmetros que não apresentaram diferença com o grupo controle (**Figura 20**).

Tabela 11: Comparação dos parâmetros morfológicos de ativação entre pacientes controles, portadores de EoE sensibilizados e portadores de EoE não sensibilizados. Valores de eosinófilos expressos em medianas (%) (n=41).

Parâmetro de ativação dos eosinófilos	Mediana dos valores de eosinófilos em percentual			Teste estatístico	P
	Controle	EoE não sensibilizado	EoE sensibilizado		
Normal	60	17	15	ANOVA	p<0,0001
Arredondado	3	10	8	Kruskal Wallis	p=0,0008
Presença de vacúolos	6,5	15	19	ANOVA	p=0,0018
Espraiamento	5,5	24,5	18	ANOVA	p= 0,0001
Emissão de grânulos em pequena quantidade	4	8	9	ANOVA	p=0,15
Emissão de grânulos em moderada quantidade	0	5,5	8	Kruskal Wallis	p<0,0001
Emissão de grânulos em grande quantidade	0	2,5	6	Kruskal Wallis	p=0,01
Pseudópodes localizados	0	9	10	Kruskal Wallis	p<0,0001
Pseudópodes generalizados	0	0	0	Kruskal Wallis	p=0,56
Presença de grânulos isolados	0	4,5	4	Kruskal Wallis	p=0,002
Degeneração celular	13	0	0	Kruskal Wallis	p=0,0001
Contato celular	0	2	4	Kruskal Wallis	p=0,16

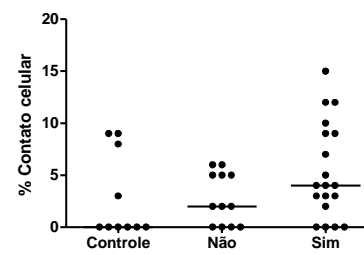
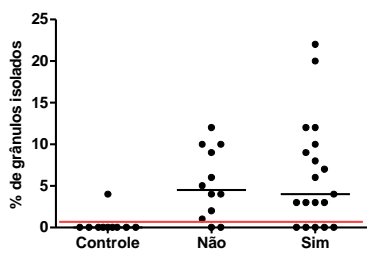
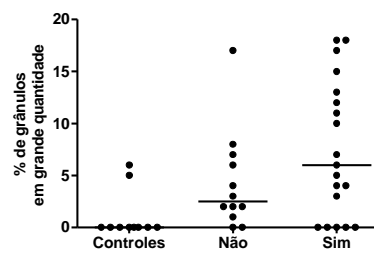
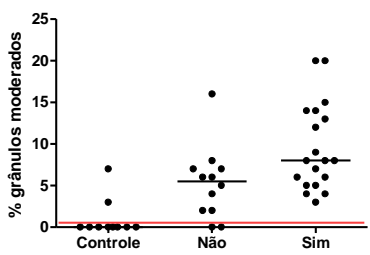
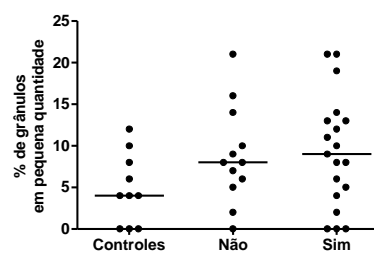
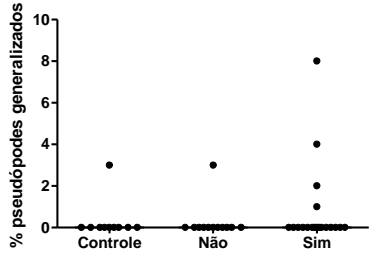
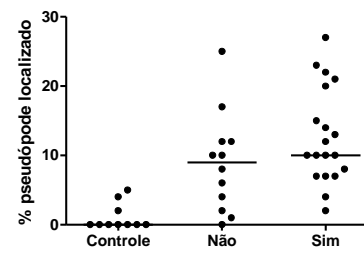
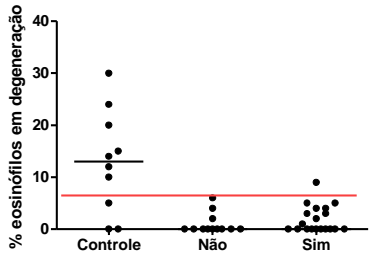
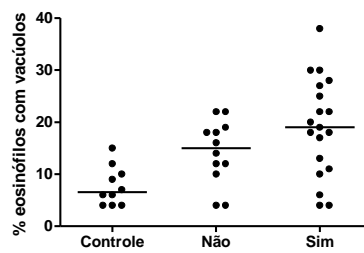
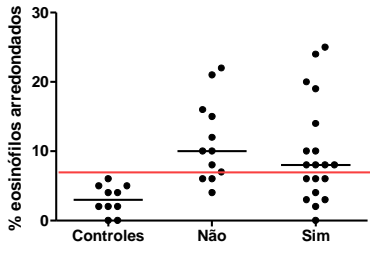
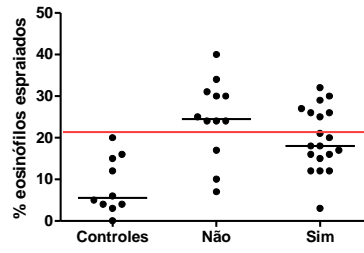
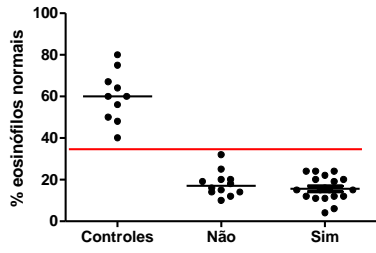


Figura 20: Comparação dos parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico entre os pacientes controles, sensibilizados a pelo menos um alérgeno e não sensibilizados. O teste só demonstrou diferenças quando comparados os pacientes controles com os sensibilizados e não sensibilizados. Os parâmetros de ativação dos eosinófilos não foram capazes de diferenciar a sensibilização ou não dos pacientes portadores de EoE

2.9. Avaliação da estimulação das vias da cicloxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase nos eosinófilos do sangue periférico de pacientes portadores de EoE

Houve um significativo aumento da expressão de COX-2 nos eosinófilos dos pacientes portadores de EoE quando comparado ao controle. Pela quantificação da fluorescência utilizando o software ImageJ observou-se uma intensa fluorescência nos eosinófilos dos pacientes com EoE, expressando maior concentração de COX-2 ($p < 0,001$) (**Figura 21**). Em relação a expressão de 5-LOX nos pacientes portadores de EoE e controle, a análise pelo ImageJ não mostrou diferença estatística na média de intensidade da imunofluorescência (4,3 versus 6,2; $p = 0,74$) (**Figura 22**).

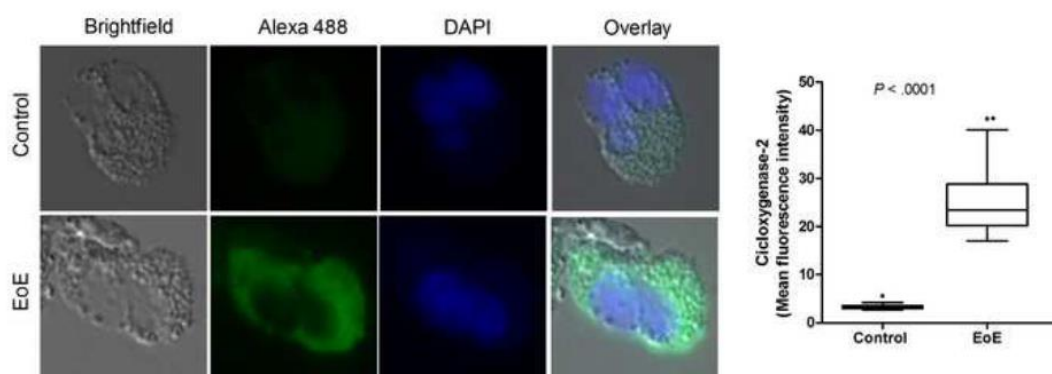


Figura 21: Imagem representativa da via da COX-2, em eosinófilos do sangue periférico, hiperestimulada nos pacientes portadores de EoE quando comparados com grupo controle, marcados por Alexa 488 ($p < 0,001$; Mann-Whitney).

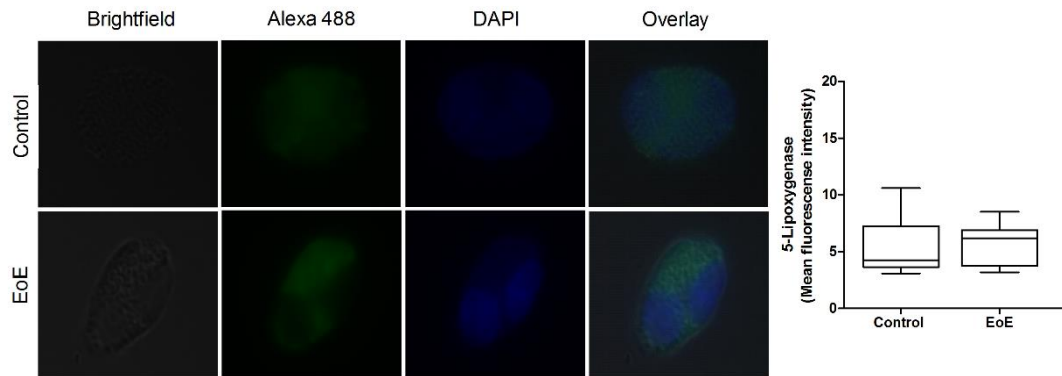


Figura 22: Imagens representativas da expressão de 5-LOX em eosinófilos do sangue periférico em pacientes portadores de EoE e controle, por microscopia de imunofluorescência. Não houve diferença entre os grupos.

DISCUSSÃO

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença emergente mundialmente, com patogênese ainda pouco compreendida (Abonia e cols, 2010). Trata-se de uma doença, imuno-antígeno mediada, crônica, caracterizada clinicamente, por sintomas relacionados à disfunção esofágica e, histologicamente, por uma predominante inflamação mediada por eosinófilos. Existe consenso mundial que a presença de 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento nas biópsias esofágica caracteriza histologicamente a doença (Papadopoulou e cols, 2014). Assim, para confirmação diagnóstica é estritamente necessária a realização de endoscopia digestiva alta com biópsia esofágica. O acompanhamento da evolução da EoE tem se mantido com múltiplas endoscopias digestivas altas seguido por biópsias, visto que níveis totais de eosinófilos do sangue periférico, eotaxina-3, neurotoxina derivada dos eosinófilos e IL-5 apesar de estarem elevados nestes pacientes, expressam baixa especificidade e sensibilidade para serem úteis no acompanhamento destes doentes (Blanchard e cols., 2011). Até o presente momento, nenhum marcador periférico foi encontrado para acompanhamento dos portadores de EoE (Chehade e cols., 2013).

A doença, geralmente inicia-se na infância/adolescência e persiste até a idade adulta. Em geral, pacientes com EoE necessitam realizar pelo menos três endoscopias digestivas anuais para controle da doença e avaliação dos tratamentos estabelecidos. Trata-se de uma metodologia invasiva e complexa, principalmente para faixa etária pediátrica.

Os eosinófilos desempenham papel central neste processo inflamatório, sendo, atualmente, alvo de vários estudos para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapias para controle da EoE.

Neste estudo inédito, avaliamos a capacidade dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos do sangue periférico em auxiliar na triagem dos pacientes sintomáticos quanto a realização de EDA, principalmente em crianças, cujo procedimento é de mais difícil execução.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes portadores de EoE e grupo controle como faixa etária, gênero, valor médio da hemoglobina e dos leucócitos totais no sangue periférico não apresentaram diferença entre os grupos estudados. A nítida predominância do sexo masculino no nosso estudo (72% dos pacientes) corresponde aos achados da literatura mundial, que mostra um percentual entre 72 a 75% dos pacientes sendo do referido gênero (Simon e

cols., 2015; Papadopoulou e cols.,2014; Chehade e Sampson, 2008; Straumann e cols., 2003;).

Com relação à faixa etária, Straumann e cols., em 2003, observaram que a idade média dos pacientes era entre 20 a 40 anos. Sgouros e cols., em 2006, observaram que o diagnóstico ocorria entre a terceira e quarta década da vida. No nosso estudo, a idade média foi de 20 anos e 3 meses, entretanto, muitos destes pacientes já apresentavam sintomas e sinais clínicos característicos desde a infância, inclusive com EDA sugestiva de EoE, mas por ser esta uma doença emergente, houve um acentuado atraso no diagnóstico dos pacientes estudados. O tempo médio entre o início dos sintomas e a realização da endoscopia digestiva alta (EDA) com biópsia positiva para o diagnóstico de EoE variou de 1 mês até 20 anos, com média de 3 anos. Os mesmos autores, realizaram um estudo de seguimento de 30 pacientes adultos por um período de 11 anos e meio e observaram que o tempo médio entre o início dos sintomas até a elucidação diagnóstica foi de 5 anos. Dez por cento dos nossos pacientes foram submetidos a tratamentos psiquiátricos ou investigações cardiológicas extensas na busca de isquemia miocárdica até terem o diagnóstico de EoE. Achem, em 2013, observou um elevado número de pacientes que apresentava dores torácicas que simulavam dores cardíacas e para comprovar hipótese que a EoE poderia causar dor torácica de origem não cardiológica, estudou 171 pacientes, por um período de dois anos, com dor torácica, nos quais a exclusão de doenças coronarianas foram excluídas. Estes pacientes foram submetidos a EDA com biópsia esofágica e encontrou-se 12% destes como sendo portadores de EoE, com biópsias com 15 ou mais eosinófilos por campo de grande aumento e predominância no sexo masculino (71% vs 34% $p=0,001$). Concluíram assim que, todo paciente, principalmente do sexo masculino, com dor torácica de origem não cardiológica deveria realizar biópsia esofágica durante a EDA, mesmo que a aparência do esôfago observada pelo EDA fosse normal.

Em relação ao número dos eosinófilos no sangue periférico nos pacientes portadores de EoE há um evidente aumento e a grande maioria cursa com eosinofilia periférica (Marlais e cols, 2011; Straumann e cols., 2003), provavelmente pelos elevados níveis de IL-5, que estimulam a medula óssea destes pacientes a produzir tais células. No nosso estudo, os achados de eosinofilia periférica também foram significativamente elevados nos pacientes

portadores de EoE quando comparados ao grupo controle e também quando comparados com Teintelbaum e cols. (2002) que referiram 50% dos pacientes com eosinofilia periférica, enquanto no nosso estudo este percentual chegou a 87% dos pacientes estudados.

Apesar de vários estudos (Rodríguez-Sánchez e cols., 2013; Marlais e cols., 2011) demonstrarem a correlação entre o número de eosinófilos do sangue periférico e eosinófilos encontrados na biópsia, bem como estes últimos serem correlacionados com os níveis de IgE total, no nosso trabalho, não encontramos correlação clínica entre os valores dos eosinófilos do sangue periférico e IgE total com o número de eosinófilos presentes na biópsia esofágica, mostrando que somente valores totais dos eosinófilos do sangue periférico não são suficientes para prever os achados microscópicos das biópsias. Sheiko e cols. (2015), relatam ser necessária a descoberta de novas metodologias que facilitem o acompanhamento clínico dos pacientes portadores de EoE. Baxi e cols. (2006), também como nosso estudo, não encontraram correlação entre os níveis de IgE do sangue periférico e o número de eosinófilos nas biópsias esofágicas.

Na análise dos níveis de IgE, foram observados somente 51,6% dos pacientes com IgE elevada no sangue periférico e não houve diferença com o grupo controle. Uma das possibilidades para explicar o fato de os níveis de IgE nos pacientes com EoE serem semelhante aos controles é a possibilidade de que a produção de IgE possa ser específica e ocorrer no próprio tecido esofágico. Vicario e cols. (2010) detectaram RNA mensageiro (RNAm) para IgE usando RT-PCR nas biópsias de pacientes portadores de EoE. Não obstante, esta produção local de IgE no epitélio esofágico não é suficiente para causar significativo aumento dos seus níveis séricos. Observa-se, também, que a mudança de isótipo para IgE nos linfócitos B pode ocorrer independentemente da interação com CD40L (Litinskiy e cols., 2002). A responsabilidade deste evento deve-se ao fator molecular ativador de linfócito B (BAFF) que é produzido por uma variedade de células incluindo células dendríticas e epiteliais, que podem atuar como segundo sinal para linfócito B, na ausência do CD40L (Kato e cols., 2009). Vale ressaltar, assim como relatam Rodríguez-Sanches e cols. (2013), que os níveis de IgE elevados não são marcadores que possam auxiliar no acompanhamento destes pacientes, visto que em até 70% dos casos, há outras atopias concomitantes, como asma, que também elevam os níveis de IgE

sérica total.

Observamos que os pacientes portadores de EoE apresentaram níveis séricos de IgA menores, estatisticamente significante, quando comparado ao grupo controle. Em três pacientes, sendo um adulto e duas crianças, ficou caracterizada uma deficiência parcial de IgA. Nossos dados são semelhantes aos previamente observados de que nos pacientes portadores de EoE, bem como nas demais alergias alimentares, é frequente níveis séricos de IgA menores, uma vez que esta imunoglobulina é um dos responsáveis pelo mecanismo de barreira mucosa, que existe no trato gastrointestinal (Arron e cols., 2015). Uma barreira epitelial deficiente de IgA, não só promove invasões bacterianas, como aumenta o risco de capturação de antígenos alimentares e posterior sensibilização aos mesmos (Per Brandtzaeg, 2010).

Vários estudos apontam uma causa alérgica para EoE, incluindo a alta incidência de outras atopias nos pacientes, a caracterização de uma resposta inflamatória Th2 no esôfago e a capacidade de induzir quadro semelhante em modelos animais, pela provocação com alérgenos específicos (Straumann e cols., 2012; Konikoff e cols., 2006).

É interessante notar que as características clínicas, histológicas e imunopatogênicas como o padrão de citocinas presentes, bem como as alterações estruturais da mucosa dos pacientes portadores de EoE, muito se assemelham aos achados da asma (Straumann e cols., 2003) e alguns autores chegam a propor que a esofagite eosinofílica seja considerada como “asma no esôfago”. Este dado, alia-se ao contexto alérgico que os portadores de EoE apresentam. Quinze a dezoito por cento dos pacientes com EoE apresentam outras atopias como asma, rinite alérgica e dermatite atópica (Damask, 2015). Em nosso estudo, observamos valores elevados de associação com outras atopias, comparados com dados de Damask, pois 58% dos nossos pacientes portadores de EoE apresentavam algum processo atópico associado, sendo que destes 28% eram portadores de asma ou tinham histórico de crises na infância e 56% apresentavam rinite alérgica associada. Nossos dados são semelhantes aos de Chehade e Sampson (2008), pois estes autores relataram que entre 50% a 70% das crianças e adultos portadores de EoE apresentaram doenças atópicas concomitantes. Spergel e cols., em 2012, relataram que dois terços dos pacientes com EoE possuíam outras atopias, sendo 37% portadores de asma e

39% dos pacientes com quadro de rinite alérgica. Estes achados correspondem a três vezes mais que os encontrados na população geral. Dez a vinte por cento das crianças portadoras de EoE apresentam IgE específica para algum determinado alimento com história de urticária e angioedema comparada com 1 a 5% das crianças não atópicas (Damask, 2015).

Relação entre EoE e algum alérgeno alimentar já tem sido estabelecida por uma série de estudos clínicos que comprovam o alimento sendo o gatilho desta doença. Entretanto, a padronização para indentificar estes alimentos por meio de testes alérgicos ainda permanece com uma tarefa árdua (Chehade e cols. 2013). Em um estudo americano (Spergel e cols.; 2002) os alimentos mais prevalentes nos testes cutâneos de leitura imediata foram, em ordem decrescente, leite de vaca, ovo, amendoim e frutos do mar. No nosso estudo, os alimentos mais prevalentes, que apresentaram prick test positivo, que é uma reação IgE mediada, foram amendoim, leite de vaca e ovo. Apesar da ordem de prevalência ser diferente da população americana, nosso estudo apontou também os mesmos alérgenos alimentares descritos mundialmente nas reações IgE mediadas. Uma diferença relatada por Straumann e cols. (2012) é que na infância o encontro de alérgenos alimentares é mais comum e uma grande maioria dos pacientes pediátricos respondem ao tratamento com dieta de exclusão, tendo reincidência da EoE após reintrodução do referido alimento. Nos adultos, o padrão de sensibilização à aeroalérgenos é mais observado. Entretanto este padrão pode não ser representante exclusivo da EoE e sim do processo conhecido como marcha atópica, que exibem pacientes portadores de doenças alérgicas (Wuahn e Mutius, 2001). No nosso estudo, não observamos esta prevalência maior de crianças sensibilizadas somente a alérgenos alimentares. Das três crianças que apresentaram reações IgE mediadas positivas para alimentos, duas estavam também sensibilizada aos aeroalérgenos.

O quadro clínico apresentado pelas crianças e adolescentes do nosso estudo, assemelha-se muito com publicações de literatura mundial. Vômitos (93% das crianças), regurgitação (80% das crianças) e dores abdominais (60% das crianças) foram os achados mais frequentes no nosso trabalho. Todos estes sintomas se confundem com um quadro de DRGE e dez crianças/adolescentes (67%) apresentavam falha terapêutica no tratamento anti-refluxo. Ainda na parte

pediátrica, encontramos um elevado índice de disfagia (66%), provavelmente por incluirmos adolescentes até 18 anos nesta casuística, que já exibem características clínicas semelhantes aos sintomas de adultos. Nos achados da literatura, o exame da lâmina própria de crianças portadores de EoE que apresentavam fibrose foi em torno de 57%, sendo que o percentual de disfagia na faixa pediátrica foi em torno de 42% (Chehade e cols., 2007). Straumann e cols. (2012) comparou as similaridades e diferenças entre adultos e crianças portadoras de EoE e verificaram que do ponto de vista clínico, dores abdominais, regurgitação, dificuldades na alimentação e recusa alimentar eram os sintomas mais prevalentes na infância. Enquanto em adolescentes e adultos, a disfagia, dor retroesternal e impactação alimentar foram os achados mais comuns.

Nos adultos, a disfagia com impactação do bolo alimentar, seja na forma intermitente ou crônica está presente entre 25 a 100% dos pacientes (Dellon, 2012). Nossos dados mostram que 50% dos adultos (n=16) já haviam apresentado pelo menos um episódio de impactação alimentar, sendo que 31,25% (n=5) necessitaram ir a um serviço para realizar EDA de emergência devido ao quadro. Estes dados são semelhantes aos observados por Liacouras e cols. (2011) que relataram uma média de 33 a 54% de pacientes adultos com necessidade de desimpactação do bolo alimentar por EDA de emergência.

Disfagia foi presente em 56,25% (n=9) e sintomas como pirose (81%) e dor abdominal ou epigástrica em 75% dos casos. Sgouros e cols. (2006) avaliaram 24 estudos com um total de 325 pacientes e encontram como sintomatologias predominantes em adultos a disfagia (93%), impactação alimentar (62%) e dor torácica simulando sintomas cardíacos em 23,6% dos pacientes estudados.

Não encontramos correlação clínica entre o número de eosinófilos no sangue periférico e IgE sérica total com o número de eosinófilos presentes na biópsia esofágica, indicando que somente valores totais dos eosinófilos do sangue periférico não são suficientes para predizer os achados microscópicos das biópsias. Straumann e cols. (2012), questionam a necessidade de uma padronização na contagem dos eosinófilos das biópsias, pois este pode ser um fator de viés entre análises de correlação. Uma das limitações de nosso trabalho, foi o fato de que as análises histopatológicas da biópsia de esôfago ter sido realizada por patologistas diferentes, pois quando incluimos os pacientes no

estudo, as biópsias já tinham sido realizadas e dos dados de que dispomos, a descrição relacionada com a fibrose não estava presente em todos os laudos. Nossos dados estão de acordo com as observações de Cheng e cols. (2012 b) que relataram em um estudo que analisou 1692 biópsias esofágicas para avaliar a profundidade destas amostras, que somente em 11% foi encontrado material subepitelial da lâmina própria, o que atrapalha em muito a descrição de fibrose. Assim, a maioria das biópsias realizadas rotineiramente fornecem poucas informações sobre o processo de remodelamento.

Um grupo de pacientes que exibem sintomas e achados histológicos semelhantes a EoE, não apresentam evidência de DRGE pela endoscopia ou pHmetria e respondem com melhora histológica e sintomática ao tratamento com IBP, e têm sido denominados serem portadores de “Eosinofilia Esofágica Respondedora a IBP”. Entre as hipóteses anteriores sobre o mecanismo de ação do IBP para esses pacientes era que o efeito importante desses IBPs era a redução da produção de ácido gástrico. Entretanto tem sido sugerido que os IBPs devem ter um efeito muito mais importante do que a simples redução ácida gástrica. Estudos demonstram que os IBPs têm potencial antiinflamatório, efeito antioxidante e inibitório sobre as funções dos neutrófilos e desta forma diminuem o processo inflamatório local. Também reduzem a produção de citocinas pelas células epiteliais e endoteliais, bem como a produção de moléculas de adesão produzidas pelos neutrófilos e células epiteliais. Ainda diminuem a produção de IL-13 e IL-4, estimulada pela eotaxina-3 nas células epiteliais esofágicas (Chehade e Sampson, 2013; Kedika e cols., 2009). Além disso, o uso de omeprazol (IBP) foi capaz de suprimir, *in vitro*, a expressão de RNAm de citocinas padrão Th2 e a secreção de eotaxina-3 das células epiteliais de pacientes portadores de EoE. Ambos grupos de autores questionam se a terapia com IBP, proposta no tratamento inicial para diferenciação dos pacientes com EoE ou somente com eosinofilia esofágica respondedora a IBP ou DRGE, é capaz de diferenciar tais doenças. Wolf e Dellon (2014) também relatam a grande controvérsia na classificação de pacientes somente com EoE, DRGE ou Eosinofilia Esofágica Respondedora a IBP, devido às ações imunoduladoras dos IBP e questionam também se a eosinofilia esofágica é uma entidade separada da DRGE ou da EOE.

No nosso estudo, não observamos este intenso potencial antiinflamatório

dos IBP's. Embora, em alguns pacientes, tenha havido redução do escore clínico após tratamento com IBP por oito semanas, não encontramos correlação com melhora endoscópica ou histológica nesses pacientes. Também não houve correlação entre o escore clínico dos sintomas apresentados pelos pacientes portadores de EoE antes da realização da EDA e o níveis séricos de IgE total e IgA. Alguns pacientes mantiveram o uso de IBP, mesmo após as 8 semanas, e este fator parece não ter influenciado o escore clínico na nossa amostra nem os exames laboratoriais em nossos pacientes, pois o fato de ter continuado com a medicação não mostrou significância estatística após e durante o tratamento. Estes dados também foram observados por Molina-Infante e cols. (2011) que estudaram 712 biópsias esofágicas de pacientes portadores de sintomas compatíveis com EoE e avaliaram, após 2 meses, o efeito do uso de rabaprazol (IBP) nos critérios clínicos e na infiltração de eosinófilos na mucosa esofágica. Observaram que, apesar de 75% dos pacientes relatarem remissão dos sintomas clínicos, pacientes que possuíam mais que 35 eosinófilos por campo de grande aumento, não tiveram alterações nos infiltrados eosinofílicos esofágicos.

Pela análise comparativa do estado de ativação dos eosinófilos entre os grupos controles e portadores de esofagite eosinofílica, encontramos um percentual significativamente menor de eosinófilos não ativados (normais) nos pacientes portadores de EoE quando comparado ao grupo controle. Há vários estudos (Lexmond e cols., 2013; Crosby e cols., 2012) que enfatizam a necessidade de se determinar o estado de ativação dos eosinófilos nas biópsias esofágicas e correlacioná-los com os achados endoscópicos e microscópicos. Crosby e cols. (2012) reforça os achados de EoE em um paciente portador de Síndrome de Hiper IgE com mutações no STAT-3 que desviam todo processo imunológico para via $Ta2$. Lexmond e cols (2013) encontraram níveis elevados de RNAm do leucotrieno C4 sintase, e mostraram que os eosinófilos das biópsias de pacientes portadores de EoE encontram-se em estado de constante desgranulação e ativação, o que contribui para a manutenção do dano epitelial e com o processo de remodelamento esofágico. Várias proteínas de superfície dos eosinófilos, que estão hiper ou hiporregulados, podem indicar seu estado de ativação, como as moléculas CD69, integrinas $\beta1$ e $\beta2$, ativação do receptor Fc ($Fc\gamma RII$), integrinas e estas têm sido alvo de biomarcadores em doenças com

fisiopatogênese semelhante a da EoE, como na asma (Johansson, 2014).

Há vários trabalhos nas literaturas que somente enfatizam o número total dos eosinófilos no sangue periférico, entretanto, o número total de eosinófilos não se correlaciona com o número de eosinófilos presentes no epitélio esofágico, sendo que o número absoluto de eosinófilos mostrou pouca relação com a gravidade da doença (Chehade e cols.; 2007). Não conseguimos encontrar nenhum estudo analisando os parâmetros de ativação dos eosinófilos do sangue periférico, para comparação com nossos dados em pacientes portadores de EoE.

Nossos dados mostraram que um percentual de 36% de eosinófilos do sangue periférico mostrando características normais (não ativados) foi um ponto de corte, na nossa amostra, separando os indivíduos portadores da EoE dos indivíduos controles normais, com 100% de sensibilidade. Esses dados sugerem que esse teste pode ser um excelente exame de triagem para indicação de endoscopia nos pacientes sintomáticos, principalmente em crianças, devido à dificuldade da realização de endoscopia digestiva alta nesta faixa etária.

Também observamos que o percentual de eosinófilos mostrando degeneração eosinofílica foi menor nos pacientes portadores de EoE, sugerindo uma maior meia-vida dos eosinófilos nestes pacientes, possivelmente devido à influência de citocinas liberadas pelo próprio epitélio esofágico como IL-5, IL-23, leucotrienos e eotaxina-3 (Spencer e cols., 2014; Virchow, 2014) que prolongam a meia-vida dos eosinófilos pela inativação de moléculas como Fas e FasL que desencadeiam a apoptose (ErJefalt e Persson, 2000). Além disso, a análise de citocinas do padrão Th2, como IL-5 e IL-13 produzidos pelas células mononucleares de pacientes portadores de EoE, muitas vezes, torna-se prejudicada pela existência de outras atopias associadas nesses pacientes, que também podem elevar tais citocinas (Chehade e cols., 2013).

No nosso estudo, avaliamos se haveria diferenças quanto a emissão de grânulos eosinofílicos, classificando-os como emissão de grânulos em pequena, moderada ou grande quantidade, o que nos dá uma idéia de ativação gradativa dos eosinófilos, e/ou a presença de agregados de grânulos isolados depositados nas lâminas, longe dos eosinófilos (grânulos isolados). Esse último parâmetro sugere que a célula estava ativada, já tinha sido estimulada para liberar os seus grânulos e já havia se movimentado na lâmina em resposta a outros estímulos.

O que sugere que esses eosinófilos estavam muito ativados. Botan, em 2010, conseguiu diferenciar esta gradação de grânulos eosinofílicos em crianças portadoras de asma no período intercrítico, onde a presença de grânulos isolados e a emissão de grânulos em grande quantidade traduziam um paciente com asma persistente grave não controlada. Seguindo a mesma linha de investigação, tentamos utilizar esta gradação para os pacientes portadores de EoE. Entretanto, não houve correlação entre a liberação de grânulos eosinofílicos e os escores de gravidade clínica ou endoscópica nos pacientes com EoE deste estudo. Tal fato pode ser explicado pelo tipo de estudo de corte transversal, um estudo de acompanhamento destes pacientes, talvez forneceria dados mais relevantes e correlacionados com gravidade clínica e endoscópica.

Os eosinófilos possuem mais de três dúzias de citocinas e grânulos estocados no seu interior, já pré-sintetizados e armazenados em grânulos intracelulares, liberados, rapidamente frente a estímulos, como o da eotaxina-3 (Spencer e cols., 2014, Kita, 2011). Os eosinófilos podem liberar grânulos por processo de desgranulação regulada em *piecemeal* (aos poucos), por exocitose clássica, na qual os grânulos se fundem com a membrana plasmática para liberar o seu conteúdo, e por citólise, na qual a membrana plasmática se rompe e os grânulos são liberados para o meio extracelular (ErJefalt e Persson, 2000; Shamri e cols., 2011; Spencer e cols., 2014). Os grânulos liberados pelos eosinófilos, engajam uma secreção *in situ* utilizando diversas vias além da simples exocitose. Na desgranulação em *piecemeal*, as citocinas derivadas dos grânulos são seletivamente mobilizadas e secretadas em pequenas porções contendo citocinas pró-inflamatórias (Spencer e cols., 2014). Entretanto, independente do processo de liberação de grânulos e citocinas pré produzidas nos eosinófilos, o resultado será um processo inflamatório intenso e é possível que esta desgranulação ocorra de forma contínua na EoE.

Saffari e colaboradores (2014), em estudos por microscopia eletrônica de tecido obtido por biópsia de esofago, mostraram que na EoE, 93% dos eosinófilos expressam duas ou mais características de desgranulação, sendo a citólise e a desgranulação tipo *piecemeal* os padrões mais comuns. O dano tecidual e o processo de regeneração acabam culminando, também com a fibrose verificada nas amostras histológicas de muitos pacientes portadores desta doença. É possível que, pelo fato deste processo de liberação de grânulos

pelos eosinófilos ser contínuo no tecido esofágico, não encontramos no sangue periférico dos pacientes portadores de EoE grandes quantidades de eosinófilos em estágios de emissão de grânulos e nem conseguimos diferenciá-los quanto a gravidade da doença. É possível que os eosinófilos mais ativados no momento da coleta do sangue dos pacientes por nós estudados, já estavam *in situ* no tecido esofágico e não circulando do sangue periférico. Outra possível explicação, é o fato de que a EoE é uma doença crônica, em que os eosinófilos estão sendo constantemente ativados, devendo portanto mostrar um menor grau de ativação do que o que ocorre com os pacientes em crise grave e aguda de asma, na qual ocorre intensa ativação desses eosinófilos, como observado por Muniz-Junqueira e cols (2013). Johansson (2014) classificou os eosinófilos do sangue periférico em diferentes potenciais de estado de ativação, incluindo não ativados, pré-ativados ou totalmente ativados, segundo a expressão de proteínas de superfície. Concluiu que em doenças inflamatórias alérgicas os eosinófilos pré-ativados ou totalmente ativados podem ser deficientes pelo fato de que estas células devem ter extravasado pelo endotélio para os tecidos envolvidos na patologia alérgica, o que está de acordo com a nossa interpretação.

Vale ressaltar que nove pacientes do nosso trabalho eram portadores de asma, e que no momento da coleta estavam com a asma controlada e não faziam uso de qualquer medicamento profilático que pudesse anular os efeitos da desgranulação vista nos pacientes somente portadores de asma, no estudo de Botan (2010). Outra possibilidade para explicar os baixos percentuais de eosinófilos desgranulando na circulação periférica nos pacientes portadores de EoE é que uma grande parte desta desgranulação deve ter ocorrido por eliminação em pequenas porções, em *piecemeal*, e que não puderam ser visualizadas por microscopia óptica, como analisados em nosso trabalho, pois são partículas pequenas e que são visualizadas principalmente por microscopia eletrônica (Saffari e cols., 2014). Embora, como mostrado por Safari e cols., em 2014, mais do que 80% dos eosinófilos no tecido esofageano estavam mostrando citólise.

A presença de eosinófilos espalhados foi o único parâmetro que mostrou relação diretamente proporcional à gravidade clínica dos pacientes portadores de EoE. E na avaliação do escore endoscópico, os parâmetros de eosinófilos

arredondados e espraçados foram inversamente proporcionais à gravidade da lesão observada pela endoscopia. Vale ressaltar que o parâmetro espraçamento reflete o eosinófilo em processo de alongamento (quimiotaxia, diapedese), entretanto com todos os seus grânulos ainda no interior da célula, bem como o eosinófilo arredondado, que ainda contém seus grânulos no interior dos eosinófilos. Esse fato sugere que, na circulação periférica, os eosinófilos ainda se encontram em grau de potencial ativação e não refletindo o processo de desgranulação, que deve ocorrer quando essas células entram no tecido esofageano.

A presença de eosinófilos arredondados, apesar de ser somente significativa entre pacientes portadores de EoE e controles, mostrou valores quase duas vezes maiores nos portadores da forma leve da EoE, quando comparados com pacientes com sintomatologia grave. Uma possível explicação para este achado é que nos pacientes mais graves, esses eosinófilos já podem ter desgranulado *in situ* no parênquima esofageano.

Os seguintes parâmetros de ativação dos eosinófilos, apresentando formas arredondadas, presença de vacúolos no interior dos eosinófilos, espraçamento, emissão de grânulos em moderada quantidade, emissão grânulos em grande quantidade, pseudópodes localizados e a presença de grânulos isolados foram mais elevados nos pacientes portadores de EoE quando comparados aos controles, podendo pela análise desses parâmetros diferenciar os pacientes portadores de EoE dos indivíduos normais, entretanto, esse teste não foi capaz de identificar a gravidade clínica, endoscópica e histológica dos pacientes portadores de EoE, provavelmente pelo fato de esta ser uma doença de evolução contínua, com processo inflamatório persistente, diferente do que nosso grupo observou em episódio agudo de asma. Botan e cols. (2010) realizaram um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo com 83 crianças asmáticas no período intercrise tratadas com montelucaste e conseguiram correlacionar os parâmetros clínicos de gravidade e resposta terapêutica com os parâmetros de ativação dos eosinófilos como: espraçamento, presença de grânulos isolados, presença de grânulos em grande quantidade, emissão de pseudópodes localizados e emissão de pseudópodes generalizados, sendo este último o parâmetro mais fidedigno de gravidade entre os pacientes asmáticos, pois foi encontrado em praticamente todos os indivíduos asmáticos.

Muniz-Junqueira e cols. (2013) estudaram crianças portadores de asma no seu período crítico e também conseguiram classificar a gravidade da crise utilizando os parâmetros de ativação eosinofílica, inclusive encontrando números maiores de parâmetros de ativação que Botan e cols. (2010), provavelmente pelo fato da análise ter sido realizada em crianças com crise aguda de asma e conseqüentemente maior possibilidade de liberação de citocinas e outras substâncias pró-inflamatórias. Silva-Martins (2013) estudou os parâmetros de ativação dos eosinófilos em crianças asmáticas em uso de corticóide inalatório e observou, também, menor porcentagem de eosinófilos não ativados antes do tratamento nas crianças com asma, independentemente da gravidade da doença, comparada as crianças controle normais, sendo que o tratamento com corticóide inalatório por seis meses aumentou significativamente a porcentagem de eosinófilos normais não ativados nas crianças com asma persistente leve e persistente moderada. Também encontrou maior porcentagem de eosinófilos com espriamento, liberação de grânulos em pequena, moderada e grande quantidade e contato celular antes do tratamento nas crianças com asma leve e moderada quando comparadas com as crianças controle normais. O tratamento com corticóide inalatório por seis meses diminuiu significativamente a porcentagem de eosinófilos ativados. Virshow (2014), comparou as alterações que ocorrem na asma com EoE e observaram que apesar de ambas doenças serem crônicas, imunomediadas caracterizadas por mudanças na mucosa e submucosa com infiltrados de eosinófilos onde a liberação de grânulos como proteína básica principal, neurotoxina derivada de eosinófilos e proteína catiônica básica causarem espessamento da lâmina própria e da camada basal, melhoram com uso de corticoterapia ou restrição ao alérgeno causador da doença (caso seja possível identificá-lo), existe algumas diferenças, principalmente no processo de evolução para fibrose entre estas duas doenças. Na EoE, diferentemente da asma, a presença de mastócitos com secreção de TGF- β (agente pró-fibrótico), contribui para uma inflamação contínua e associada à presença de eosinófilos contribuem para produção de colágeno tipo 1 e ativação de fibroblastos que culmina com o processo de fibrose, visto nos pacientes portadores de EoE (Bochner e Gleich, 2010).

Além disso, é provável que a maior expressão da via da ciclooxigenase nos eosinófilos de pacientes com EOE pode ser fator de aumento da resposta

inflamatória dependente de prostaglandina. Esta molécula é desencadeada pela via da COX - 2. A Prostaglandina E2 promove a resposta Th2 , como é observado em pacientes portadores de EoE. Além disso, a inibição da via da 5 - LOX com montelucaste, um antagonista seletivo do receptor para o leucotrieno D4, foi ineficaz para manter a remissão induzida por esteróides em adultos portadores de EoE. No entanto, Lewis e cols (2009) mostraram regulação negativa da expressão da COX-2 nas biópsias de esofágicas de pacientes com EoE, quando comparados aos pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e de indivíduos controle. Esta discrepância pode refletir a cinética da resposta imune na esofagite eosinofílica.

Assim, nosso estudo mostrou pela primeira vez que os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos do sangue periférico, apesar de não diferenciarem a gravidade clínica, endoscópica e histológica dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica, foram capazes de diferenciar pacientes controles sadios daqueles portadores de EoE com sensibilidade de 100%. Isso sugere que esse teste pode ter importante aplicação clínica como um teste de triagem para decisão de indicação ou não do exame endoscópico nos pacientes sintomáticos, principalmente crianças, devido à dificuldade de realização de endoscopia digestiva alta nesta faixa etária e propiciando a realização de um exame muito menos invasivo, de fácil realização, de baixo custo e que necessita apenas a coleta de um pouco de sangue de veia periférica.

Novos estudos necessitam ser realizados com acompanhamento dos pacientes para determinar se nosso teste de ativação periférica dos eosinófilos pelos parâmetros morfológicos são capazes de auxiliarem no acompanhamento dos pacientes portadores de EoE.

CONCLUSÕES

Considerando os seguintes resultados obtidos com este trabalho, concluímos que:

1. Os parâmetros clínicos dos pacientes estudados com EoE foram semelhantes ao descrito na literatura referente ao sexo, exames laboratoriais, produção de IgA e IgE, expressão clínica, exame endoscópico, exame histopatológico da biópsia do esôfago e correlação da EoE com outras atopias. Mais de 80% dos pacientes, apresentavam sensibilização aos ácaros da poeira doméstica e dentre os alimentos mais comuns, encontramos amendoim, leite de vaca e ovo.
2. Não houve correlação entre o número de eosinófilos presentes no sangue periférico, como também da concentração de IgE total sérica com o número de eosinófilos presentes na biópsia esofágica, mostrando que a análise de somente o número total dos eosinófilos do sangue periférico não foi capaz de definir a doença nem prever os achados microscópicos das biópsias de esôfago nos pacientes com EoE.
3. O número de eosinófilos no sangue periférico com características normais foi significativamente menor nos indivíduos portadores de esofagite eosinofílica do que nos indivíduos controle. Este parâmetro foi capaz de discriminar todos os indivíduos portadores de EoE estudados dos indivíduos do grupo controle não portadores da doença. Mostrando portanto uma sensibilidade de 100% para detecção da EoE nos indivíduos estudados, considerando para definição diagnóstica os parâmetros atualmente definidos pela

4. Considerando o número total de eosinófilos com características morfológicas normais ou presença de algum parâmetro de ativação foi possível caracterizar o valor de 36% de eosinófilos normais como ponto de corte que separou 100% dos indivíduos portadores de EoE dos indivíduos controles do nosso estudo.
5. Os parâmetros característicos de ativação dos eosinófilos: aspecto arredondado, presença de vacúolos no no citoplasma dos eosinófilos, espraiamento, emissão de grânulos em moderada quantidade, emissão de grânulos em grande quantidade, presença de pseudópodes localizados e a presença de grânulos isolados foram significativamente mais elevados nos pacientes portadores de EoE quando comparados ao grupo controle.
6. Apenas para o parâmetro porcentagem de eosinófilos espraiados houve correlação inversamente proporcional à gravidade clínica nos pacientes portadores de EoE. Não houve correlação com a gravidade clínica para os demais parâmetros de ativação dos eosinófilos analisados.
7. Nenhum dos parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos foi capaz de discriminar a gravidade observada pelo exame endoscópico entre os pacientes portadores de EoE.
8. O número de eosinófilos por campo, quantificado com aumento de 400X, observados nos exames histopatológicos da nas biópsias esofágicas não mostrou correlação estatística com nenhum dos parâmetros morfológicos analisados nos eosinófilos obtidos do sangue periférico. Nenhum dos parâmetros de ativação dos eosinófilos foi capaz de diferenciar pacientes que estavam sensibilizados a algum alérgeno dos indivíduos não sensibilizados.

9. Houve uma maior expressão de ciclooxigenase-2 em pacientes portadores de EoE quando comparados ao controle, entretanto não encontramos diferenças quanto a expressão de 5-lipoxigenase.

10. Nossos dados mostraram que os parâmetros morfológicos de ativação dos eosinófilos do sangue periférico, apesar de não diferenciarem a gravidade clínica, endoscópica e histológica dos pacientes portadores de esofagite eosinofílica, foram capazes de diferenciar pacientes controles sadios daqueles portadores de EoE com sensibilidade de 100%. Isso sugere que esse teste pode ter importante aplicação clínica como um teste de triagem para decisão de indicação ou não do exame endoscópico nos pacientes sintomáticos, principalmente crianças, devido à dificuldade de realização de endoscopia digestiva alta nesta faixa etária e propiciando a realização de um exame muito menos invasivo, de fácil realização, de baixo custo e que necessita apenas a coleta de um pouco de sangue da veia periférica.

Portanto, neste trabalho demonstramos que avaliação dos parâmetros morfológicos do estado de ativação dos eosinófilos foram capazes de caracterizar os pacientes portadores de EoE. O método utilizado para avaliar a ativação dos eosinófilos mostrou-se acurado, de fácil execução, baixo custo e utiliza pequeno volume de sangue, podendo facilmente ser realizado na prática clínica, principalmente em crianças. O número total de eosinófilos apresentando parâmetros morfológicos de ativação pode ser um marcador do processo inflamatório observado na EoE e detectado por esse teste analisando eosinófilos do sangue periférico. A sua utilização poderá ser uma ferramenta útil no arsenal de exames não invasivos para os indivíduos portadores de EoE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceves SS, Nebury RO, Dohil R, Bastian JF, Broide DH. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 206-212.

Abonia JP, Blanchard C, Butz BB, Rainey HF, Collins MH, Stringer K, Putnam PE, Rothenberg ME. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:140-149.

Aceves SS, Nebury RO, Dohil R, Bastian JF, Broide DH. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 206-212.

Aceves SS. Food and aeroallergens in eosinophilic esophagitis: role of the allergist in patient management. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 30: 391-395.

Achem SR. Is eosinophilic esophagitis a cause of noncardiac chest pain? *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1300: 100-118.

Arron JR, Townsend MJ, Keir ME, Yaspan BL, Chan AC. Stratified medicine in inflammatory disorders: From theory to practice. *Clin Immunol* 2015;161(1):11-22.

Atkins D; Furuta GT. Mucosal immunology, eosinophilic esophagitis, and other inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S255-S261.

Attwood S, Smyrk TC, Demeester TR, Jones JB. Esophageal eosinophilia with dysphagia: a distinct clinicopathologic syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 109-116.

Baxi S, Gupta SK, Swigonski N, Fitzgerald JF. Clinical presentation of patients with eosinophilic esophagitis inflammation of the esophagus. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 473-478.

Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, Collins MH, Putnam PE, Wells SI, Rothenberg ME. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6): 1293-1300.

Blanchard C, Struke EM, Rodrigues Jimenez B e cols. A striking local esophageal cytokine expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 208-217.

Blanchard C; Wang N; Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis: pathogenesis, genetics and therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1054-1059.

Bochner BS, Gleich GJ. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:16-25.

Bochner BS. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: S292-S302.

Botan V. Influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos em crianças asmáticas. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2010.

Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010;26(6):554-563.

Chehade M e Sampson HA. Epidemiology and Etiology of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2008; 18: 33-44.

Chehade M e Sampson HA. The role of lymphocytes in eosinophilic gastrointestinal disorders. *Immunol Allergy Clin N Am* 2009 29:149-158.

Chehade M, Lucendo AJ, Achem SR, Souza RF. Causes, evolution, and consequences of eosinophilic esophagitis. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1300: 110-118.

Chehade M, Sampson HA, Marotti RA et al. Esophageal subepithelial fibrosis in children with eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:319-328.

Chehade M. Translational research on the pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2008;18:145-156.

Cheng E, Souza RF, Spechler SJ. Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver*. 2012;303:G1175-1187.(a)

Cheng E, Zhang X, Huo X, Yu C, Zhang Q, Wang DH, Spechler SJ, Souza RF. Omeprazole blocks eotaxin-3 expression by esophageal squamous cells from patients with eosinophilic esophagitis and GORD. *Gut*. 2012; 62: 824-832.(b)

Crosby K, Swender D, Chernin L, Hafez-Khayyata S, Ochs H, Tcheurekdjian H, Hostoffer R. Signal transducer and activator of transcription 3 mutation with invasive eosinophilic disease. *Allergy Rhinol* 2012; 3:94-97.

Damask C. Update on eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 23:240-246.

Dellon ES, Gonsalves N, Hirano I, Furuta GT, Liacouras CA, Katzka DA. American College of Gastroenterology Clinical Guideline: Evidence Based Approach to the Diagnosis and Management of Esophageal Eosinophilia and Eosinophilic Esophagitis (EoE) – Practice Guidelines. *Am J Gastroenterol* 2013; 127:1-14.

Dellon ES. Diagnosis and management of eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 1066-1078.

Dennis EA, Norris PC. Eicosnoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:511-523.

Desai TK, Stecevic V, Chang CH, Goldstein NS, Badizadegan K, Furuta GT. Association of eosinophilic inflammation with esophageal food impaction in adults. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 795-801.

Erjefalt JS, Persson CGA. New aspects of desgranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 2074-2085.

Erwin EA; James HR; Gutekunst HM; Russo JM; Kelleher KJ e Platts-Mills TAE. Serum IgE measurement increases detection of food allergy among pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104(6):496-502.

Silva-Martins CMF. Influência do tratamento com corticóide inalatório na ativação dos eosinófilos e função fagocitária em crianças e adolescentes com asma. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2013.

Ferreira CT, Vieira MC, Gonçalves Vieira SM, Silva GS, Yamamoto DR, Silveira TR. Esofagite eosinofílica em 29 pacientes pediátricos. *Arq Gastroenterol* 2008; 45:141-146.

Forte WCN, Carvalho Junior FF, Fernandes Filho WD, Shibata E, Henriques LS, Mastroni RA. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata com o evoluir da idade. *J Pediatr* 2001; 77 (2): 112-118.

Fujimura MD. Níveis séricos das subclasses de IgG em crianças normais e nefróticas – Tese de Doutorado – FMUSP – São Paulo, 1991.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:651-663.

Gonçalves C; Silva F; Cotrim I. Esofagite eosinofílica. J Port Gastroenterol 2005; 12:172-176.

Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. Clin Exp Allerg 2014; 44 (4): 482-498.

Jung KW, Gunderson N, Kopacova J. Occurrence of and risk factors for complication after endoscopic dilatation in eosinophilic esophagitis. Gastrointest Endosc 2011;73:15-21.

Kalinski T, Zwönitzer R, Robner M, Hofmann H, Roessner A, Guenther T. Digital imaging and communications in medicine (DICOM) as standard in digital pathology. Histopathology 2012; 61:132-134.

Kagalwalla AF, Setongo TA, Ritz S, Hess T, Nelson SP, Emerick KM, Melin-Aldana H, Li BU. Effect of six-food elimination diet on clinical and histologic outcomes in eosinophilic esophagitis. Clin Gastroenterol Hepatol 2006; 4: 1097-1102.

Kato A; Xiao H; Chustz RT; Liu MC; Schleimer RP. Local release of B-cell activating factor of TNF family after segmental allergen challenge of allergic subjects. J Allergy Clin Immunol 2009; 123: 369-375.

Katzka D. The “skinny” on eosinophilic esophagitis. Cleveland Clin J Med 2015; 82: 83-88.

Kedika RR, Souza RF, Spechler J. Potential antiinflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications. Dig Dis Sci. 2009; 54: 2314-2317.

Kelly KJ, Lazenby AJ, Rowe PC, Yardley JH, Perman JA, Sampson HA. Eosinophilic esophagitis attributed to gastroesophageal reflux: improvement with an amino acid-based formula. Gastroenterology 1995; 109: 1503-1512.

Kirsch R, Bokhary R, Marcon MA. Activated mucosal mast cell differentiate eosinophilic esophagitis from gastrointestinal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:20-26.

Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunological Reviews* 2011; 242: 161-177.

Konikoff MR, Noel RJ, Blanchard C, Kirby C, Jameson SC, Buckmeier BK, Akers R, Cohen MB, Collins MH, Assa'ad AH, Aceves SS, Putnam PE, Rothenberg ME. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fluticasone propionate for pediatric eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* 2006;131(5):1381-91.

Lewis CJ, Lamb CA, V. Kanakala V, Lamb CA, Kanakala V, Pritchard S, Armstrong GR, Attwood SE. Is the etiology of eosinophilic esophagitis in adults a response to allergy or reflux injury? Study of cellular proliferation markers. *Dis Esophagus* 2009;22: 249–255.

Lexmond SW, Pardo M, Rooney K, Goettel JA, Snapper SB, Yen EH, Dehlink E, Nurko S. Elevated levels of leukotriene C4 synthase mRNA distinguish a subpopulation of eosinophilic oesophagitis patients. *Clin Exp Allergy* 2013; 43 (8): 902-913.

Liacouras CA e Ruchelli E. Eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Pediatr* 2004; 16:560-566.

Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, Atkins D, Attwood SE, Bonis PA, Burks AW, Chehade M, Collins MH, Dellon ES, Dohil R, Falk GW, Gonsalves N, Gupta SK, Katzka DA, Lucendo AJ, Markowitz JE, Noel RJ, Odze RD, Putnam PE, Richter JE, Romero Y, Ruchelli E, Sampson HA, Schoepfer A, Shaheen NJ, Sicherer SH, Spechler S, Spergel JM, Straumann A, Wershil BK, Rothenberg ME, Aceves SS. Eosinophilic esophagitis: updated consensus

recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:3-20.

Liacouras CA, Spergel JM, Ruchelli E, Verma R, Mascarenhas M, Semeao E, Flick J, Kelly J, Brown-Whitehorn T, Mamula P, Markowitz JE. Eosinophilic Esophagitis: a 10-year experience in 381 children. *Clin Gastr Hepatol* 2005; 3: 1198-1206.

Liacouras CA, Wenner WJ, Brown K, Ruchelli E. Primary eosinophilic esophagitis in children: successful treatment with oral corticosteroids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 380-385.

Liacouras CA. Eosinophilic esophagitis in children and adults. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37(Suppl1): S23-28.

Litinsky MB, Nardely B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3: 822-829.

Lucendo AJ, Navarro M, Comas C, Pascual JM, Burgos E, Santamaría L, Larrauri J. Immunophenotypic characterization and quantification of the epithelial inflammatory infiltrate in eosinophilic esophagitis through stereology: an analysis of the cellular mechanisms of the disease and the immunologic capacity of the esophagus. *Am J Sur Pathol.* 2007; 31:598-606.

Marlais M, Francis ND, Fell JM, Rawat DJ. Blood tests and histological correlates in children with eosinophilic oesophagitis. *Acta Paediatr* 2011;100(8):e75-79.

Markowitz JE, Spergel JM, Ruchelli E, Liacouras CA. Elemental diet is an effective treatment for eosinophilic esophagitis in children and adolescents. *Am J Gastroenterol* 2003;98:777-782.

Marques SMB. Estado de ativação dos eosinófilos e função fagocitária de

neutrófilos e monócitos em crianças asmáticas. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2003.

Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis in mice. *J Clin Invest* 2001;107: 83-90.

Molina-Infante J, Ferrante-Lamana L, Ripoll C, Hernandez-Alonso M, Mateos JM, Fernandez-Bermejo M, Duenas C, Fernandez-Gonzalez N, Quintana EM, Gonzalez-Nunez MA. Esophageal eosinophilic infiltration responds to proton pump inhibition in most adults. *Clin Gastr Hepat* 2011; 9: 110-117.

Muniz-Junqueira MI, Barbosa-Marques SM, Junqueira LF Jr. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children. *Allergy* 2013; 68:911-920.

Noel RJ. Eosinophilic esophagitis. *N Engl J Med* 2004; 351: 940-941.

Papadopoulou A., Koletzko S, Heuschkel R, Dias JA, Allen KJ, Murch SH, Chong S, Gottrand F, Husby S, Lionetti P, Mearin ML, Ruemmele FM, Schäppi MG, Staiano A, Wilschanski M, Vandenplas Y. Management Guidelines of Eosinophilic Esophagitis in Childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58: 107-118.

Peterson KA, Byrne KR, Vinson LA Ying J, Boynton KK, Fang JC, Gleich GJ, Adler DG, Clayton F. Elemental diet induces histologic response in adult eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 759-766.

Rodríguez-Sánchez J, Torrijos EG, Santa-Belda E, López-Viedma B, Dávila FM, Pilkington-Woll JP e cols. Effectiveness of serological markers of eosinophil activity in monitoring eosinophilic esophagitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2013; 105:462-467.

Rothenberg ME. *Biology and Treatment of Eosinophilic Esophagitis.*

Gastroenterology 2009; 137:1238-1249.

Saffari H, Hoffman LH, Peterson KA, Fang JC, Leiferman KM, Pease LF. Electron microscopy elucidates eosinophil desgranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133(6):1728-1734.

Sgouros SN, Bergele C, Mantides A. Eosinophilic esophagitis in adults: what is the clinical significance? *Endoscopy* 2006; 38: 515-520.(a)

Sgouros SN, Bergele C, Mantides A. Eosinophilic esophagitis in adults: a systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:211-217. (b)

Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 2011;343:57–83.

Sheiko MA, Feinstein JA, Capocelli KE, Kramer RE. The concordance of endoscopic and histologic findings of 1000 pediatric EGDs. *Gastrointest Endosc* 2015; 81: 1385-1391.

Simon D, Radonjic-Hösli S, Straumann A, Yousefi S, Simon HU. Active eosinophilic esophagitis is characterized by epithelial barrier defects and eosinophil extracellular trap formation. *Allergy* 2015 70:443-452.

Simon D; Simon HU. Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1291-1300.

Spencer LA, Bonjour K, Melo RCN, Weller PF. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Frontiers Immunol* 2014;5:1-9.

Spergel JM, Beausoleil JL, Mascarenhas, Liacouras CA. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 363-368

Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, Wang ML, Verma

R, Liacouras CA. Identification of causative foods in children with eosinophilic esophagitis treated with an elimination diet. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 461-467.

Straumann A, Aceves SS, Blanchard C, Collins MH, Furuta GT, Hirano I, Schoepfer AM. Pediatric and adult eosinophilic esophagitis: similarities and differences. *Allergy* 2012; 67:477-490.

Talley NJ, Kephart GM, McGovern TW, Carpenter HA, Gleich GJ. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. *Gastroenterology* 1992; 103:137-145.

Teitelbaum JE. Natural history of primary eosinophilic esophagitis: a follow-up of 30 adult patients for up to 11.5 years. *Gastroenterology* 2003;125:1660-1669.

Teitelbaum JE, Fox VL, Twarog FJ, Nurko S, Antonioli D, Gleich G, Badizadegan K, Furuta GT et al. Eosinophilic esophagitis in children: analysis and response to fluticasone propionate. *Gastroenterology* 2002; 122:1216-1225.

Terris B, Potet F. Structure and role of Langerhans's cells in the human oesophageal epithelium. *Digestion* 1995; 56:9-14.

Valent P, Gleich GR, Reiter A, Roufosse F, Weller PF, Hellmann A, Metzgeroth G, Leiferman KM, Arock M, Sotlar K, Butterfield JH, Reiterer SC, Mayerhofer M, Vandenberg P, Haferlach T, Bochner BS, Gotlib J, Horny HP, Simon HU, Klion AD. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol* 2012; 5 (2):157-176.

Vicario M; Blanchard C; Stringer KF; Collins MH; Mingler MK; Ahrens A,

Putnam PE, Abonia JP, Santos J, Rothenberg ME. Local B cells and IgE production in the esophageal mucosa in eosinophilic esophagitis. *Gut* 2010; 59: 12-20.

Virchow JC. Eosinophilic esophagitis: asthma of the esophagus? *Dig Dis* 2014; 32:54-60.

Wolf WA, Dellon ES. Eosinophilic esophagitis and proton pump inhibitors: controversies and implications for clinical practice. *Gastroenterol Hepato* 2014; 10: 427-432.

Wuahn U, Mutius E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 567-574.

Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:162-176.

Yamazaki K, Murray JA, Arora AS, Alexander JA, Smyrk TC, Butterfield JH, Kita H. Allergen-specific in vitro cytokine production in adults patients with eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1934-1941.

ANEXOS

ANEXO 1

**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília pela Plataforma Brasil**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica. **Pesquisador:** Valéria Botan Gonçalves **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 36933514.0.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

852.987 **Data da**

Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

Bem apresentado e com argumentações sólidas

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se os parâmetros quantitativos de ativação dos eosinófilos apresentam valor preditivo para avaliação clínica e prognóstico em pacientes portadores de esofagite eosinofílica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: não há riscos significativos. O risco envolvido na coleta de sangue é mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa fundamentada em sólida base e com possibilidades de criar um teste barato e fácil para acompanhamento e prognóstico dos pacientes afetados

Considerações sobre os Termos de apresentação

obrigatória: bem elaborados

Recomendações:

explicitar os parâmetros endoscópicos para facilitar a compreensão do projeto

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 852.987

Conclusões ou Pendências e Lista de

Inadequações: sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto "Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica", após apresentação do parecer do relator, foi aprovado sem pendências.

BRASILIA, 31 de Outubro de 2014

Assinado por:
Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: fmd@unb.br

ANEXO 2

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Paciente portador de Esofagite Eosinofílica – Maior de Idade**

**Termo de consentimento livre e esclarecido
(Paciente com esofagite eosinofílica)**

Projeto de Pesquisa: Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica

Universidade de Brasília – Laboratório de Imunologia Celular – Faculdade de Medicina

RESPONSÁVEIS: Dra. Valéria Botan e Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

Eu,....., abaixo assinado,.....anos, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar no projeto de pesquisa “Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica”. Esclarecemos que este projeto vai verificar o funcionamento de algumas células do seu organismo para podermos entender melhor a sua doença. Este estudo poderá trazer benefícios para os pacientes, uma vez que o esclarecimento deste funcionamento permitirá uma melhor avaliação, seguimento e possibilidade terapêutica para os pacientes.

Concordo que seja retirado de 1 a 10 mL de sangue de uma veia do meu braço. Fui esclarecido(a) que o material utilizado para retirada do meu sangue será estéril e descartável. Fui esclarecido(a) que os possíveis medicamentos utilizados são os mesmos que eu utilizaria no atendimento normal da minha doença, independentemente desta pesquisa.

Uma possível complicação que pode ocorrer é o desconforto da coleta de sangue e uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue.

Concordo que a Dra. Valéria Botan utilize uma pequena parte do material da biópsia do meu esôfago, que se encontra no _____, para realização de alguns exames para esta pesquisa. Fui esclarecido(a) que o bloco de parafina contendo o material coletado da biópsia será devolvido ao referido laboratório sem nenhum dano pela Dra Valéria.

Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado dos exames que serão feitos no meu sangue.

Fui esclarecido que o meu nome não será divulgado. As informações obtidas são confidenciais e serão publicadas anonimamente. Os nomes dos participantes serão mantidos em absoluto sigilo, não acarretando, assim, prejuízos à minha privacidade.

A participação neste estudo é *voluntária* e a qualquer momento este consentimento poderá ser retirado por mim. Fui esclarecido que se eu não quiser participar nesta pesquisa não haverá nenhum prejuízo para o tratamento e acompanhamento da minha doença.

Em caso de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, o(a) senhor(a) deve procurar o pesquisador responsável pelo número de telefone abaixo, a fim de saná-las. Em caso de dúvidas poderá entrar em contato com:

a) Dra. Valéria Botan- telefone celular: (0xx61) 9649-9911

Brasília,..... de de 2014.

Voluntário (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

Nome e assinatura da testemunha

Nome e Assinatura do pesquisador

OBS: Com cópia para o paciente

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Paciente Portador de Esofagite Eosinofílica - Menor de Idade

**Termo de consentimento livre e esclarecido
(MENOR DE IDADE)**

Projeto de Pesquisa: Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica

Universidade de Brasília – Laboratório de Imunologia Celular – Faculdade de Medicina

RESPONSÁVEIS: Dra. Valéria Botan e Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

Eu,....., abaixo assinado, pai, mãe ou responsável pelo(a) menor ,anos, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) a autorizar a participação do(a) seu filho(a) menor de idade no projeto de pesquisa “Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica”. Esclarecemos que este projeto vai verificar o funcionamento de algumas células do organismo do seu filho(a) para podermos entender melhor a doença dele (a). Este estudo poderá trazer benefícios para os pacientes, uma vez que o esclarecimento deste funcionamento permitirá uma melhor avaliação, seguimento e possibilidade terapêutica para os pacientes.

Concordo que seja retirado de 1 a 10 mL de sangue de uma veia do braço do meu filho(a). Fui esclarecido(a) que o material utilizado para retirada do meu sangue será estéril e descartável.

Uma possível complicação que pode ocorrer é o desconforto da coleta de sangue e uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue.

Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado dos exames que serão feitos no sangue de meu filho(a).

Fui esclarecido que o nome do meu filho(a) não será divulgado. As informações obtidas são confidenciais e serão publicadas anonimamente. Os nomes dos participantes serão mantidos em absoluto sigilo, não acarretando, assim, prejuízos à privacidade da sua família.

A participação neste estudo é *voluntária* e a qualquer momento este consentimento poderá ser retirado por mim.

Em caso de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, o(a) senhor(a) deve procurar o pesquisador responsável pelo número de telefone abaixo, a fim de saná-las. Em caso de dúvidas poderá entrar em contato com:

a) Dra. Valéria Botan- telefone celular: (0xx61) 9649-9911

Brasília,..... de de 2014.

Voluntário (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

Nome e assinatura da testemunha

Nome e Assinatura do pesquisador

OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável

OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável

ANEXO 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Controle Sadio

ANEXO 5

Termo de Anuência do Paciente Menor de Idade

**Termo de anuência da criança com esofagite eosinofílica
(MENOR DE IDADE)**

Projeto de Pesquisa: Valor preditivo dos parâmetros de ativação dos eosinófilos em pacientes portadores de esofagite eosinofílica
Universidade de Brasília – Laboratório de Imunologia Celular – Faculdade de Medicina

RESPONSÁVEIS: Dra. Valéria Botan
 Prof. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

(Nome da criança)

.....
....., (.....anos), você está sendo convidado(a) a participar do trabalho que a tia Valéria está fazendo, e que vai ajudar muitas outras crianças que têm a mesma doença que você tem melhorarem.

Se você concorda que a tia tire um pouquinho do seu sangue para estudar você vai escrever o seu nome lá embaixo, onde está marcado o seu nome. Seu pai e sua mãe já deixaram a tia Valéria tirar um pouquinho do seu sangue. Agora a tia está perguntando para você, se você também concorda em dar um pouquinho do seu sangue.

A tia Valéria está avisando a você, que você vai sentir uma picadinha no braço e que pode doer um pouquinho. É igual das outras vezes que você tirou o sangue para fazer exames.

Se você não concordar, ninguém vai ficar chateado com você e o tratamento para você melhorar vai continuar da mesma maneira que antes.

Brasília,..... de de 2014.
 Concordo em participar do trabalho da tia Valéria.

Criança (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

Nome e assinatura da testemunha

Nome e assinatura dos pais ou responsáveis pela criança

Nome e Assinatura do pesquisador

OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável

ANEXO 6

Protocolo Clínico de Pesquisa

PROTOCOLO CLÍNICO DE PESQUISA

Valéria Botan Gonçalves

ORIENTADORA: Profa. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Laboratório de Imunologia, Área de Patologia.

Faculdade de Medicina / Universidade de Brasília

1. Identificação:

Nome:		
Registro no Projeto	SES:	Gênero: Fem () Masc ()
Data de nascimento: __/ __/ __	Idade:	
Filiação:		
Endereço:	Telefone:	

2. Critérios de Inclusão:

<p>- Crianças, adolescentes e adultos portadores de esofagite eosinofílica (EoE) com biópsia compatível e não respondedores aos inibidores de bomba de prótons encaminhados de serviços de Gastroenterologia e/ou Alergia da cidade de Brasília.</p> <p>- Concordância dos pais, responsáveis ou do próprio paciente nos casos de maior idade (18 anos) em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.</p>
--

3. Critérios de Exclusão:

Neoplasias; Síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; Doenças de depósitos ou Erros inatos do metabolismo; Doenças da Tireóide; Doença Celíaca; Doenças auto-ímmunes (ARJ, LES, Dermatomiosite, Vasculites.); Acalasia; Pênfigo; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Hipo/Agamaglobulinemia; Doença de Crohn; Uso de imunossupressor; Reação de hipersensibilidade a drogas e Parasitose intestinal
--

4. Formas Clínicas Associadas

() Asma	Tratamento:
() Rinite Alérgica	Tratamento:
() Dermatite Atópica	Tratamento:
() Conjuntivite Alérgica	Tratamento:

5. Fatores de risco

História Familiar de atopia	
Uso frequente de medicação anti RGE	

--	--

Início dos sintomas:

Data do Diagnóstico:

6. Critérios Clínicos (antes do diagnóstico)

SINTOMAS	0	1	2	3	4
	Nenhum	Ocasional	Mensal	Semanal	Diários
Vômitos					
Regurgitação					
Dor abdominal					
Dor epigástrica					
Pirose - queimação					
Dor torácica					
Disfagia					
Engasgos durante refeição					
Necessidade de ingesta de líquido para alimentar-se					
Disfagia	Nenhuma 0	Sólidos 1	Pastoso 2	Líquido 3	Saliva 4
Baixo ganho ponderal Ou perda ponderal	Ausente 0	Presente 1			
Impactação do alimento	Ausente 0	Presente 1			
Ida ao PS para EDA devido impactação alimentar	Ausente 0	Presente 1			
Outros sintomas					
Pontuação total					

7. Sintomas clínicos atuais

SINTOMAS	0	1	2	3	4
	Nenhum	Ocasional	Mensal	Semanal	Diários
Vômitos					
Regurgitação					
Dor abdominal					
Dor epigástrica					
Pirose - queimação					
Dor torácica					
Disfagia					
Engasgos durante refeição					
Necessidade de ingesta de líquido para					

alimentar-se					
Disfagia	Nenhuma 0	Sólidos 1	Pastoso 2	Líquido 3	Saliva 4
Baixo ganho ponderal Ou perda ponderal	Ausente 0	Presente 1			
Impactação do alimento	Ausente 0	Presente 1			
Ida ao PS para EDA devido impactação alimentar	Ausente 0	Presente 1			
Outros sintomas					
Pontuação total					

8. Critérios Endoscópicos

Edema (diminuição das marcas vasculares ou palidez mucosa)	Anéis concêntricos (traqueização)	Exsudato Pontilhado esbranquiça do	Estrias verticais	Constricção (diminuição do diâmetro)	Papel crepom Fragilidade mucosa
Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0	Ausente 0
Presente 1	Leve 1	Leve (> 10% da área esofágica) 1	Presente 1	Presente 1	Presente 1
	Moderada (não impede passagem do endoscópio) 2	Grave (<10% da área esofágica) 2			
	Grave (ausência da passagem do endoscópio) 3				
Endoscopia normal ()		Pontuação total: _____			

9. Achados Microscópicos (EDA do diagnóstico)

Número de eosinófilos/campo	
Microabscessos	
Estratificação superficial dos eosinófilos	
Hiperplasia células basais	
Fibrose lâmina própria	
Presença de linfócitos/monócitos ou outras células inflamatórias	

10. Achados Microscópicos (EDA mais atual)

Número de eosinófilos/campo	
Microabscessos	
Estratificação superficial dos eosinófilos	
Hiperplasia células basais	
Fibrose lâmina própria	
Presença de linfócitos/monócitos ou outras células inflamatórias	

11. Tratamento

Tipo		Período de uso
Dieta elementar	Sim () Não ()	
Dieta exclusão	Alimento (s):	
IBP	Esomeprazol 20 () 40 ()	
	Omeprazol 20 () 40 ()	
	Pantoprazol 20 () 40 ()	
Corticóide tópico	Fluticasona () dose:	
	Budesonina () dose:	
Corticóide oral	Prednisona () dose:	
Montelucaste	Dose:	
Nenhum tratamento	Sim () Não ()	

Prick test – anexar

Realizou patch test - anexar

Outras informações úteis

Data: ____/____/____

Pesquisador Clínico

ANEXO 7

Perfil dos pacientes portadores de Esofagite Eosinofílica

Perfil dos pacientes portadores de EoE

Nome	Idade	Sexo	Atopias Associadas				História familiar	Uso de Anti RGE
			Asma	Rinite	DA	Conjuntivite		
AABPGC	32	M	sim	sim	não	não	sim	não
GLSML	14	M	sim	sim	não	não	sim	sim
LNC	5	M	não	não	SIM	não	sim	não
DVT	40	M	não	não	não	não	sim	não
CESS	5	M	não	nao	não	não	sim	sim
MCSS	2	F	sim	sim	não	não	sim	não
RAFSN	42	M	sim	sim	não	não	sim	sim
EOM	11	M	não	sim	não	sim	sim	sim
CAS	15	F	sim	sim	não	não	sim	não
ASV	12	M	não	sim	não	sim	sim	não
GAR	9	M	sim	sim	não	não	sim	não
LMCC	9	M	não	não	não	não	sim	não
FESB	3	M	sim	sim	não	não	sim	não
LRB	5	F	não	sim	não	não	sim	sim
ASA	7	M	sim	sim	não	não	não	sim
CGSS	21	M	sim	sim	não	não	sim	não
ALPC	36	M	não	não	não	não	não	não
CTM	10	M	não	sim	não	não	sim	não
APPAA	31	F	não	não	não	não	sim	sim
CSL	24	F	não	não	não	não	não	sim
GBB	27	M	não	não	não	não	sim	não
EBA	52	M	não	sim	não	não	sim	sim
NGCJ	31	M	não	não	não	não	não	sim
CJM	26	F	não	não	não	não	sim	não
GLLB	5	M	sim	sim	sim	não	sim	sim
VSNP	23	M	não	sim	não	não	sim	não
YS	10	M	não	não	não	sim	sim	não
TRB	29	F	não	não	não	não	não	não
GAR	29	M	não	sim	não	não	não	sim
FCFF	35	M	não	não	não	não	sim	não
LBC	32	M	não	sim	não	não	sim	não

M=masculino F= feminino DA= dermatite atópica

Uso de Anti-RGE significa que o paciente no momento da coleta de sangue estava em uso de IBP.

ANEXO 8

Perfil do grupo controle

Anexo 8: Perfil dos pacientes controles saudáveis.

Identificação	Idade	Sexo
VBG	35	F
BHSP	26	M
PB	31	M
RGV	42	M
SAR	32	M
JPMS	7	F
MJOB	37	M
MPS	29	M
DPJ	22	M
PG	27	F

Sexo: M=masculino, F=feminino;

ANEXO 9

**Planilha dos valores do teste de puntura com leitura imediata
(prick test) em todos os pacientes**

Valores expressos em mm de todos pacientes portadores de EoE e seus respectivos resultados do prick test.

Nome	Derm pt	Derm far	Blomia	Fungos	LV	Alfalacto	Betalacto	Caseína	Ovo	Trigo	Soja	Camarão	Amendoim	Carne Bovina	LV in natura	Soja in natura	Negativo	Histamina
AABPGC	9	10	4	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	5
GLSML	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	5	0	0	0	0	5
LNC	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	13	0	0	0	0	8
DVT	8	10*	2	0	0	0	2	0	5	0	3	0	0	0	3	0	0	5
CESS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
MCSS	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
RAFSN	4	5	0	3	5	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	10
EOM	7	8	5	0	0	0	0	3	0	4	5	0	0	0	0	0	0	10
CAS	6	4	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
ASV	10*	13*	9	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
GAR	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
LMCC	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
FESB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
LRB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ASA	4	12*	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CGSS	11*	9*	7*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
ALPC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
CTM	5	4	5	2	2	4	3	0	4	0	0	4	0	0	5	0	0	14
APPAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
CSL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
GBB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
EBA	5	9*	7*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
NGCJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
CJM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
GLLB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
VSNP	11*	11*	13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14*	0	0	0	0	10
YS	5	5	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	10
TRB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
GAR	3	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	7
FCFF	11*	17*	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
LBC	7	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9

Derm pt = *Dermatophagoides pteronissinus*

Derm far = *Dermatophagoides farinae*

Blomia = *Blomia tropicalis*

LV= leite de vaca

Alfalacto = Alfalactoalbumina

Betalacto = Betalactoglobulina

*** significa presença de pseudópodes durante a leitura.**