

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/04/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, POR
IMUNOISTOQUÍMICA, NA PELE DE CÃES ATÓPICOS COM A
UTILIZAÇÃO DE OCLACITINIB COMERCIAL E GENÉRICO

JULIANA CALTABELLOTTA GOMES MORAD

Botucatu - SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, POR
IMUNOISTOQUÍMICA, NA PELE DE CÃES ATÓPICOS COM A
UTILIZAÇÃO DE OCLACITINIB COMERCIAL E GENÉRICO

JULIANA CALTABELLOTTA GOMES MORAD

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de
Araújo Machado

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Morad, Juliana Caltabellotta Gomes.

Avaliação da resposta inflamatória, por imunoistoquímica, na pele de cães atópicos com a utilização de oclacitinib comercial e genérico / Juliana Caltabellotta Gomes Morad. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado
Capes: 50501062

1. Dermatite atópica. 2. Janus quinases. 3. Interleucinas. 4. Prurido.

Palavras-chave: Dermatite atópica; Interleucina; Janus quinase .

Nome do autor: Juliana Caltabellotta Gomes Morad

Título: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA, POR IMUNOISTOQUÍMICA, NA PELE DE CÃES ATÓPICOS COM A UTILIZAÇÃO DE OCLACITINIB COMERCIAL E GENÉRICO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Drª Ana Cláudia Balda
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
FMU – São Paulo

Data da defesa: 30 de abril de 2019.

Aos meus filhos, Isadora e Lucas. Vocês são a razão da minha vida.

Aos meus pais, João e Liala. Muito obrigada por me ensinarem os valores da responsabilidade, persistência e determinação.

Ao meu marido, Fábio. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado. Amo você.

À minha irmã, Ana Carolina, pelos conselhos, amizade e união.

À todos os meus pacientes caninos e felinos, que me inspiram a aprender e a fazer diferença em suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai de amor e bondade, por me segurar durante as dificuldades e me guiar diante os períodos de incertezas.

Ao meu marido e meus filhos, por pacientemente suportarem minhas ausências. Que este período traga a nossa família grande exemplos de dedicação, abnegação e persistência.

Aos tutores que de todos os animais que participaram do projeto, pela paciência e assiduidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado, por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves, pela orientação e ajuda com toda a parte de imuno-histoquímica. Sem você não conseguiria realizar este trabalho.

Às minhas colegas de pós-graduação Ana Paula e Camila. Vocês foram um presente que a vida me deu durante este período. Espero que nossa amizade continue para sempre.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – ácidos graxos essenciais

ALD – *Atopic like dermatites*

ASIT – imunoterapia alérgeno-específica

DA - Dermatite atópica

DAC - Dermatite atópica canina

ICADA – força tarefa internacional na dermatite atópica canina

IFNs – interferons

IgE – imunoglobulina E

ILs – interleucinas

JAK - Janus quinase

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios de Favrot 2010 para Dermatite Atópica Canina	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para a técnica de imuno-histoquímica e suas respectivas especificações e diluições	40
Tabela 2 – Mediana (Mínimo – Máximo) das variáveis e valor p da comparação entre os momentos 0 e 30	42
Tabela 3 – Resultados finais das citocinas e filagrina avaliadas	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores patogênicos responsáveis pela inflamação cutânea e prurido em cães com dermatite atópica e suas interações.....	9
Figura 2 – Liberação dos mediadores da alergia na reação alérgica	10
Figura 3 – Localizações mais comuns das lesões clínicas e prurido associados com DA e alergia alimentar	16
Figura 4 – Áreas corporais mais acometidas por DA canina em diferentes raças	18
Figura 5 – Famílias de citocinas que utilizam enzimas janus quinase (JAK) para sinalização	30
Figura 6 – Distribuição dos escores de CADESI-4 nos dois momentos avaliados	43
Figura 7 - Distribuição dos escores de prurido nos dois momentos avaliados	43
Figuras 8 e 9 – Cão Mel, 2 anos, fêmea, raça Shih-tzu no dia 0 de tratamento	44
Figuras 10 e 11 – Cão Mel, 2 anos, fêmea, raça Shih-tzu no dia 30 de tratamento	44

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Epidemiologia da dermatite atópica	4
2.2 Imunopatogênese da dermatite atópica canina	5
2.3 Citocinas	13
2.4 Apresentação clínica da dermatite atópica	16
2.5 Diagnostico da dermatite atópica	19
2.5.1. Critérios de Favrot	19
2.5.2 Características do exame histopatológico.....	20
2.6 Diagnostico diferencial	21
2.7 Tratamento	21
2.7.1 Imunoterapia	22
2.7.2 Corticoide tópico	23
2.7.3 Corticoide sistêmico	23
2.7.4 Ciclosporina	23
2.7.5 Anti-histamínicos	24
2.7.6 Cuidados com a pele e pelagem	24
2.7.6.1 Suplementação com ácidos graxos essenciais	25
2.7.6.1 Aplicação de formulações tópicas contendo EFA	25
2.7.7 Anticorpos monoclonais	26
2.8 Oclacitinib	26
2.8.1 Mecanismo de ação	28
2.8.2 Efeitos colaterais	31
2.8.3 Resposta clínica	32
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Amostragem e local.....	35
4.2 Critérios de inclusão e exclusão no estudo.....	35
4.3 Diagnóstico da dermatite atópica.....	35
4.4 Metodologia.....	37

4.5	Processamento das amostras de pele e imuno-histoquímica.....	39
4.6	Interpretação dos resultados.....	39
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	42
7	DISCUSSÃO	45
8	CONCLUSÃO	47
9	BIBLIOGRAFIA	48
10	TRABALHO CIENTÍFICO	56
	Anexos.....	76

RESUMO

MORAD, J. C. G. **Avaliação da resposta inflamatória, por imunoistoquímica, na pele de cães atópicos com a utilização de oclacitinib comercial e genérico** [Assessment of the inflammatory response by immunohistochemistry in the skin of atopic dogs with the use of commercial and generic oclacitinib]. 2019. 86 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu, 2018.

Dermatite atópica (DA) canina é uma enfermidade alergoinflamatória de caráter crônico, da pele e orelha externa, geralmente de cães adultos jovens, induzida por distintos alérgenos. A afecção tem etiopatologia complexa e ainda não totalmente elucidada, dificilmente atingindo cura. Porém, há hoje, várias opções medicamentosas para o seu controle. O oclacitinib faz parte da recente remessa de medicamentos para tratamento e controle do prurido dos cães atópicos, com poucos efeitos colaterais. É um fármaco inibidor de janus quinase, com rápida ação e que age na ligação das citocinas aos receptores JAKs. Este trabalho teve como intuito avaliar a resposta inflamatória da pele de animais atópicos, antes e 30 dias após o tratamento com Oclacitinib comercial (Apoquel®), através da mensuração das interleucinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31, TNF- α , IFN- γ e filagrina, pela técnica de imuno-histoquímica, além da resposta clínica ao tratamento pela avaliação do CADESI-4 e escore do prurido. Os 10 cães utilizados no estudo são provenientes do atendimento dermatológico do HV da UNESP-Botucatu e clínica particular de Sorocaba-SP. Apenas os escores do CADESI-4, do prurido e da IL-1, citocina inflamatória chave da imunidade inata e na patogênese da DA, apresentaram redução na análise estatística. Concluiu-se que a IL-1 pode ter um papel importante na farmacocinética do oclacitinib e maiores estudos são necessários para confirmar a ação do oclacitinib sobre a produção e ligação da IL-1 aos receptores cutâneos em cães com DA, assim como novos fármacos que contemplam estas propriedades.

Palavras-chave: Dermatite atópica, Janus kinase, Interleucina, Prurido.

ABSTRACT

MORAD, J. C. G. **Avaliação da resposta inflamatória, por imunoistoquímica, na pele de cães atópicos com a utilização de oclacitinib comercial e genérico** [Assessment of the inflammatory response by immunohistochemistry in the skin of atopic dogs with the use of commercial and generic oclacitinib]. 2019. 86 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Botucatu, 2018.

Canine atopic dermatitis (DA) is a chronic inflammatory allergic disease of the skin and external ear, usually of young adult dogs, induced by distinct allergens. The disease has complex and still not fully elucidated etiology, hardly reaching cure. However, there are today several drug options for your control. Oclacitinib is part of the recent consignment of medications for treatment and control of the itching of atopic dogs, with few side effects. It is an inhibitor drug of Janus Kinase, with rapid action and acting in the binding of cytokines to jaks receptors. The objective of this work was to evaluate the inflammatory response of the skin of atopic animals before and 30 days after treatment with commercial oclacitinib (Apoquel®), through the measurement of interleukines il-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31, TNF- α , IFN- γ and Filagrin, by immunohistochemistry technique, in addition to clinical response to treatment by evaluation of Cadesi-4 and pruritus score. The 10 dogs used in the study are from the dermatological treatment of HV of UNESP-Botucatu and private Clinic of Sorocaba-SP. Only the scores of Cadesi-4, pruritus and IL-1, the key inflammatory cytokine of innate immunity and the pathogenesis of DA, showed a reduction in the statistical analysis. It is concluded that IL-1 may play an important role in the pharmacokinetics of oclacitinib and further studies are needed to confirm the action of oclacitinib on the production and binding of IL-1 to cutaneous receptors in dogs with DA, as well as new drugs that can contemplate these properties.

Key words: Atopic dermatitis, Janus kinase, Interleukin, Pruritus.

1 INTRODUÇÃO

Dermatite atópica (DA) é uma doença alérgica de pele comum, crônica, recorrente, inflamatória e pruriginosa, com muitas semelhanças clínicas entre seres humanos e cães. Em ambas as espécies, a patogênese da DA envolve alteração no sistema imunológico (muitas vezes mediada por IgE) e disfunção de barreira cutânea decorrentes de uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais (OLIVRY et al., 2016). Fontes (2015) descreve que a DA humana é resultante de uma reação imunológica mista. Na fase aguda, há uma reação IgE-mediada (tipo I) e na fase crônica, há associação à hipersensibilidade celular (tipo IV).

Já para Little et al. (2015), a DA canina é uma condição multifatorial na qual envolve células dendríticas cutâneas, linfócitos T, uma variedade de outras células e alteração da função da barreira cutânea como parte central no processo da doença. Alérgenos ambientais que penetram na barreira cutânea desencadeiam uma complexa reação imunológica que envolve a ativação de muitas citocinas diferentes que conduzem este processo, resultando em inflamação cutânea e mecanismos neuronais que iniciam o ciclo do prurido que nunca cessa.

Com o aumento do conhecimento, a DA canina é cada vez mais vista como uma descrição clínica ou síndrome, com uma variedade de manifestações e potenciais causas subjacentes que variam de paciente para paciente (DEBOER, 2014).

A DA canina foi definida por muitos anos como uma desordem bastante simples do sistema imunológico: meramente uma reação de hipersensibilidade mediada por IgE, do tipo imediata, causada pela exposição a alérgenos ambientais através da via inalatória. Porém, muitos cães apresentam dermatite extrema, sem sinais respiratórios; há relatos de pacientes humanos atópicos sem envolvimento de IgE demonstrável e cães atópicos “clássicos” com testes negativos de alergia (DEBOER, 2014).

Atualmente, é reconhecida uma condição paralela designada como dermatite de tipo atópica (*atopic like dermatitis*, ALD), que apresenta o mesmo conjunto de sinais clínicos da DA. Entretanto, no caso da ALD não é possível

documentar, através dos métodos habitualmente utilizados, uma resposta mediada por IgE aos alérgenos ambientais ou a outros alérgenos (OLIVRY et al., 2010).

Para Fortes (2015), processos infecciosos e/ou fatores emocionais são fatores agravantes ou mesmo desencadeantes da manifestação clínica em humanos. Em cães atópicos, há uma resposta a IgE significativamente maior aos antígenos de *Staphylococcus pseudointermedius*, o que sugere um papel imunopatogênico para IgE anti-*Staphylococcus*. No entanto, são necessários estudos suplementares para definir a resposta imune a antígenos e superantígenos específicos aos estafilococos envolvidos na DA canina (BEXLEY et al., 2013).

O manejo clínico racional da DA canina é necessário, já que a DA é geralmente uma doença crônica que pode ser controlada, mas raramente curada (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Orientações para o controle da DA canina foram produzidas pelo Comitê Internacional para doenças alérgicas dos animais (ICADA). Os tratamentos mais eficazes com base em revisões sistemáticas são os seguintes: agentes anti-inflamatórios, incluindo glicocorticoides tópicos e orais, ciclosporina oral e tacrolimus tópico; terapia antimicrobiana para controlar infecções bacterianas ou fúngicas secundárias; banhos com xampus não irritantes; e imunoterapia alérgeno-específica. Não há protocolo de tratamento universal e o controle dos cães com DA precisa ser adaptado a cada caso concreto com base na resposta à terapia, potencial para efeitos adversos, os custos da medicação em conformidade com o proprietário (LITTLE et al., 2015).

O prurido associado à DA canina é uma queixa frequente na prática clínica veterinária geral e especializada (LITTLE et al., 2015) e representa um recurso clínico chave na árvore de diagnóstico diferencial da dermatite atópica. Longos períodos de prurido podem afetar a qualidade de vida de cães atópicos e seus proprietários; portanto, os tratamentos que podem reduzir o prurido de maneira rápida e efetiva estão em grande demanda (GONZALES et al, 2015).

Citocinas, incluindo interleucinas (ILs), interferons (IFNs) e outras moléculas, utilizam o sinal transdutor da janus quinase (JAK) e ativador da transcrição (JAK-STAT) como via para transmitir sinais da membrana celular

- A região da pele em que foi feita a biópsia (cervical dorsal) não é acometida em boa parte dos cães atópicos.

Porém, a interleucina 1 apresentou variação significativa entre o dia 0 e o dia 30 de tratamento. Até o presente momento, não há trabalhos que avaliaram sua resposta ao oclacitinib.

Em humanos, IL-1 e seus ligantes são citocinas inflamatórias chaves da imunidade inata e tem um papel importante na patogênese da DA, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, com alteração na barreira cutânea. Drogas neutralizantes de IL-1 têm demonstrado completa supressão ou redução marcada da resposta inflamatória em estudos clínicos e modelos experimentais de desordens alérgicas comuns (ABRAMOVITS et al., 2013). Maiores estudos são necessários para confirmar a ação do oclacitinib sobre a produção e ligação da IL-1 aos receptores cutâneos em cães com DA, assim como novas drogas que contemplam estas propriedades.

A resposta clínica ao tratamento com oclacitinib foi positiva, com diminuição do CADESI-4 e do escore de prurido de RYBNIČEK et al. (2008), confirmando os trabalhos de COSGROVE et al. (2013 e 2015), GADEYNE et al. (2014), GONZALES et al. (2013 e 2014) e OLIVRY et al. (2015).

CONCLUSÃO

O tratamento com Apoquel® (maleato de oclacitinib) por 30 dias, com a dose e frequência recomendada pelo fabricante, não alterou as citocinas gerais pró-inflamatórias, as citocinas presentes na resposta Th1, Th2 e Th17, assim como na barreira cutânea, mensurada neste trabalho pela análise da filagrina. Apenas a IL-1 apresentou variação estatística significativa neste período.

A resposta clínica e eficácia no tratamento da dermatite atópica com oclacitinib em cães foi comprovada através da redução do CADESI-4 e escore de prurido.

REFERENCIAS

ABRAMOVITS, W et al. **Role of interleukin 1 in atopic dermatites.** *Dermatology clinics*, v.31, p. 437-444, 2013.

BANOVIC, F. et al. **Immunomodulatory *in vitro* effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production.** *Veterinary Dermatology*, v.30, p.17-e6, 2019.

BARBOSA, L.C. **Análise imuno-histoquímica da proteína interleucina 31e filagrina e sua relação com o grau de prurido e restauração da barreira cutânea, antes e após o uso de solução repositora de lipídeos na epiderme de cães com dermatite atópica.** 2015. 92f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BIZIKOVA, P. et al. Review: **Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis.** *Veterinary Dermatology*, v.26, p.79–e24, 2015.

COSGROVE, S. B. et al. **Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis.** *Veterinary Dermatology*, v.24, p.479-e114, 2013.

COSGROVE, S. B. et al. **Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life.** *Veterinary Dermatology*, v.26, p.171-e35, 2015.

DEBOER, D. J. **Introduction: canine atopic dermatitis as an evolving, multifactorial disease.** In: C. NOLI.; A. FOSTER; W. ROSENKRANTZ. *Veterinary Allergy* (1^a ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell, p.5-7, 2014.

FUKUYAMA, T. et al. **Topically Administered Janus-Kinase Inhibitors Tofacitinib and Oclacitinib Display Impressive Antipruritic and Anti-Inflammatory Responses in a Model of Allergic Dermatitis.** *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v.354, p.394–405, 2015.

GADEYNE, C. et al. **Efficacy of oclacitinib (Apoquel) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia.** *Veterinary Dermatology*, v.25, p.512-e86, 2014.

GONZALES, A. J. et al. **Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis.** *Veterinary Dermatology*, v.24, p.48-e12, 2013.

GONZALES, A. J. et al. **Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.37, p.317-324, 2014.

GONZALES, A. J. et al. **IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics.** *Veterinary Dermatology*, v.27, p. 34-e10, 2016.

HENSEL, P. et al. **Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification.** *BMC Veterinary Research*, v.11:196, p.1-13, 2015.

LITTLE, P. R. et al. **A blinomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs.** *Veterinary Dermatology*, v.26, p.23-e8, 2015.

OLIVRY, T. et al. **Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis.** *Veterinary Dermatology*, v.21, p. 233-248, 2010.

OLIVRY, T. et al. **Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 update guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA).** *BMC Veterinary Research*, v.11:210, p.1-15, 2015.

OLIVRY, T. et al. **Early Activation of Th2/Th22 Inflammatory and Pruritogenic Pathways in Acute Canine Atopic Dermatitis Skin Lesions.** *Journal of Investigative Dermatology*, v.136, p.1961-1969, 2016.

PUCHEU-HASTON, C. M. et al. **Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1–T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis.** *Veterinary Dermatology*, v.26, p.124–e32, 2015.

RYBNÍČEK, J. et al. **Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs.** *Veterinary Dermatology*, v.20, p.115-122, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; OLIVRY, T. **An update on the treatment of canine atopic dermatitis.** *The Veterinary Journal*, v.207, p.29-37, 2016.

