

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA SÉRICA DE CÃES ATÓPICOS  
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
– AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO

BEATRIZ RODRIGUES BERBEL

Botucatu – SP  
SETEMBRO, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA SÉRICA DE CÃES ATÓPICOS  
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
– AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO

BEATRIZ RODRIGUES BERBEL

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

Botucatu – SP  
SETEMBRO, 2018

**FICHA CATALOGRÁFICA**

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

Berbel, Beatriz Rodrigues.

Análise imunoenzimática sérica de cães atópicos submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais : avaliação do perfil inflamatório / Beatriz Rodrigues Berbel. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado  
Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Dermatite atópica. 3. Imunomodulação. 4. Prurido. 5. Terapia celular.

Palavras-chave: barreira cutânea; imunomodulação; prurido; terapia celular.

Nome: BEATRIZ RODRIGUES BERBEL

Título: Análise imunoenzimática sérica de cães atópicos submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais – avaliação do perfil inflamatório.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dr. Thiago Neves Batista

Membro titular

Departamento de Medicina Veterinária

Centro de Ciências da Saúde Furb/Blumenau

Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

DATA DA DEFESA: 28 de setembro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Sonia e Genildo, que são a minha essência e meus princípios, devo a eles tudo que sou hoje. Obrigada por todo incentivo, apoio e compreensão nesses anos. E toda minha família, meus avós e irmão, por toda ajuda durante esses anos para que fosse possível me dedicar para este projeto.

Ao meu querido professor orientador Luiz Henrique de Araújo Machado que me acompanha desde a graduação, a quem me espelho como profissional e como pessoa, um amigo, e muitas vezes um pai, que levarei para a vida toda.

A faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) Unesp Botucatu, por todo apoio durante minha vida acadêmica, onde me formei, fiz residência e agora concluo o mestrado.

A FAPESP pelo auxílio financeiro processo 2015/23876-4, possibilitando a realização deste trabalho.

A professora Maria Lúcia Gomes Lourenço, que me acompanha desde a graduação, e me incentivou na vida acadêmica.

A minha querida amiga Bianca Mariani Meneghim por todo o auxílio e orientação ao longo deste projeto, e por toda paciência e dedicação em me ajudar.

Ao meu querido amigo José Francisco Antunes Ribeiro, por todo companheirismo não só durante o mestrado, mas em qualquer momento em que precisei e fui amparada.

A todos meus amigos de Sorocaba e colegas de trabalho por entender muitas vezes a minha ausência.

BERBEL, B.R. Análise imunoenzimática sérica de cães atópicos submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais – avaliação do perfil inflamatório. Botucatu, 2018. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

## RESUMO

A dermatite atópica canina (DAC) apresenta uma complexa relação entre a inflamação e a barreira cutânea. O envolvimento de resposta imunológica do tipo Th2 e Th1, bem como produção de citocinas pró inflamatórias têm sido relacionadas com o padrão inflamatório, sinais clínicos e a gravidade da doença. As células-tronco mesenquimais (CTM) possuem características imunomoduladoras, sendo altamente sugeridas para reduzir a produção de citocinas inflamatórias e melhorar a qualidade de vida de animais atópicos. Visando comparar o efeito das CTM em cães atópicos, realizamos um estudo randomizado, simples-cego, com período inicial de placebo em seis cães. Foram comparados os perfis séricos inflamatórios por ELISA, além de resposta clínica por CADESI-04 e escala analítica de prurido. Ao final do estudo, os cães melhoraram significativamente o padrão clínico por CADESI-04 ( $p < 0,001$ ) e pela escala de prurido ( $p < 0,05$ ), contudo não houve mudança no perfil inflamatório das citocinas. Foi observado reações adversas em dois animais do estudo. Concluindo, o uso de CTM pode ser eficaz na melhora da sintomatologia relacionada a doença.

**Palavras-Chave:** terapia celular, imunomodulação, barreira cutânea, prurido

BERBEL, B.R. Serum immunoenzymatic analysis of atopic dogs submitted to mesenchymal stem cell transplantation - evaluation of the inflammatory profile. Botucatu, 2018. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

## **ABSTRACT**

Canine atopic dermatitis (CAD) presents a complex relationship between inflammation and cutaneous barrier. The involvement of Th2 and Th1 type immune responses, as well as the production of proinflammatory cytokines have been related to inflammatory pattern, clinical signs and severity of disease. Mesenchymal stem cells (MTCs) have immunomodulatory characteristics and are highly suggested to reduce the production of inflammatory cytokines and to improve quality of life of atopic animals. In order to compare effects of MTCs on atopic dogs, we performed a randomized, simple-blind, placebo-controlled study in 6 dogs. Inflammatory serum profiles were compared by ELISA, in addition to clinical response by CADESI-04 and analytical pruritus scale. At the end of the experiment, dogs significantly improved the clinical standard for CADESI-04 ( $p < 0.001$ ) and pruritus scale ( $p < 0.05$ ), however, there was no change in the inflammatory cytokine profile. Adverse reactions were observed in two study animals. Concluding that the use of CTM may be effective in improving symptoms related to disease.

**Key Words:** cellular therapy, immunomodulation, skin barrier, itch

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT .....	VII
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 PATOGÊNESE.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.1 Funções da Barreira Epidérmica.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2 Alterações na Barreira Epidérmica.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3 Filagrina .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DAC.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 CÉLULAS TRONCO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 CTM NA IMUNOMODULAÇÃO E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6 CÉLULAS TRONCO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS: .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	25
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSÕES PRELIMINARES .....</b>	<b>52</b>
REFERENCIAS.....	53

# Capítulo I

## 1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença de pele pruriginosa comumente associada à anticorpos IgE e a alérgenos ambientais, compartilhando muitas características com a dermatite atópica humana, como uma predisposição hereditária, similaridade histopatológica e prurido como sinal clínico predominante (OLIVRY et al., 2010).

Sabe-se que mutações gênicas não justificam o aparecimento dos sinais clínicos, apontando para uma nova perspectiva sobre uma disfunção da barreira lipídica da pele (OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2012), que pode ser responsável pelo aumento da sensibilização por alérgenos externos, estimulando o sistema imune, levando a uma resposta Th2 (INMAN et al., 2001; OLIVRY et al., 2010).

O estrato córneo é composto por lipídios epidérmicos, ceramidas, colesterol, sulfato de colesterol, ésteres de ácidos graxos de colesterol, ácidos graxos livres e esfingosina. Uma alteração na concentração desses lipídeos pode gerar um aumento da perda de água da epiderme (INMAN et al., 2001).

As citocinas Th2, que estão presentes nas lesões agudas da DA, foram relacionadas por regular negativamente a expressão da filagrina (MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011), outra proteína que compõem a barreira cutânea responsável pela queratinização adequada da pele, evitando a perda de água transepidérmica e dificultando a entrada de alérgenos (JUNGERSTED et al., 2010). Essa regulação da expressão da filagrina causa um impacto adicional sobre a função da barreira da pele (MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011). A expressão da IL-31, citocina do perfil Th2, é considerada maior em lesões pruriginosas em relação às não pruriginosas (SONKOLY et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células indiferenciadas que compartilham a capacidade de auto renovação e diferenciação (WAGERS; WEISSMAN, 2004) e têm propriedades imunológicas potencialmente únicas, relatando notável capacidade regenerativa e anti-inflamatória (MULLER & KIRK, 2013).

Foi demonstrado que a CTM é capaz de suprimir a ativação de células T *in vivo* e *in vitro*, modulando a função imune das principais populações celulares envolvidas no reconhecimento e na eliminação aloantígeno, incluindo células apresentadoras de antígeno, as células T e células natural killer (RASMUSSEN, 2006). Além disso em condições *in vitro*, essas células alteram o padrão de citocinas pelas células T helper, diminuem a liberação de mediadores inflamatórios e inibem a proliferação de células T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

As CTM reduzem a produção de citocinas inflamatórias e bloqueiam a ativação de células T, além de poderem estimular as células locais residentes, como queratinócitos e células progenitoras, a proliferar, migrar e reparar lesões de pele e doenças (DAHL, 2012; HARMAN, 2013).

Assim, o uso de CTM em ensaios clínicos aumenta e têm evocado a promessa em estratégias mais avançadas e melhores tratamentos para uma variedade de doenças, dentre elas a dermatite atópica canina (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; SI et al., 2011; WEBSTER et al., 2012).

A perspectiva do uso de CTM em terapias para dermatopatias é promissora, porém são necessários mais estudos para sustentarem uma resposta clínica favorável e estabelecimento de protocolos (HALL et al., 2010).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização da terapia com células tronco mesenquimais na resposta inflamatória de cães diagnosticados com dermatite atópica.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA**

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença de pele pruriginosa comumente associada a anticorpos IgE. Alérgenos ambientais e aeroalérgenos, tais como ácaros, poeira doméstica e pólen são um dos fatores que desencadeiam essa resposta. Em alguns casos, pode estar ligada a alérgenos de origem microbiana e alimentares (OLIVRY et al., 2010).

A dermatite atópica humana ou eczema atópico (SILVESTRE SALVADOR; ROMERO-PÉREZ; ENCABO-DURÁN, 2017) compartilha muitas características com a DAC, como predisposição hereditária, similaridade histopatológica e prurido como sinal clínico predominante (JAEGER et al., 2010; OLIVRY et al., 2010).

Atualmente, estima-se que a incidência da doença constitua 10% da população canina (NUTTALL; URI; HALLIWELL, 2013). Já em humanos, sabe-se que 7,1% a 12,5% dos portadores da doença são pediátricos (ANTUNES et al., 2017) e 1% a 3% são adultos (SILVESTRE SALVADOR; ROMERO-PÉREZ; ENCABO-DURÁN, 2017).

### **2.2 PATOGÊNESE**

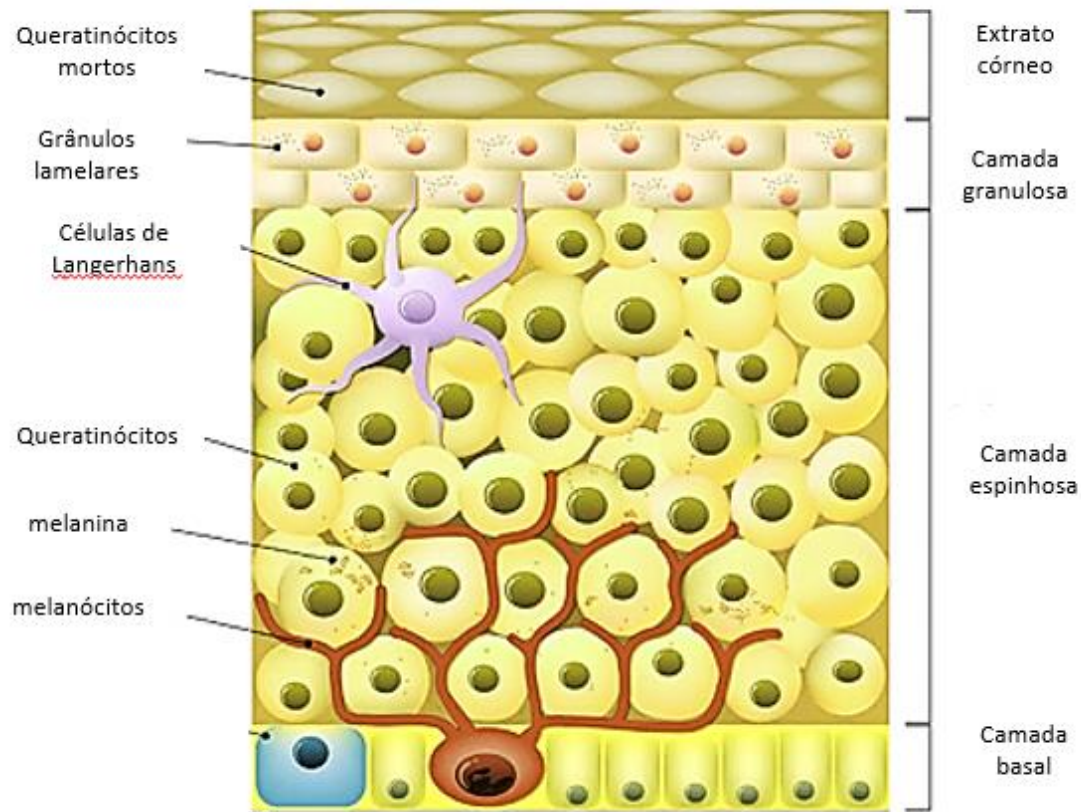
#### **2.2.1 Funções da Barreira Epidérmica**

Tem sido proposta uma nova perspectiva sobre a importância da disfunção da barreira lipídica da epiderme em indivíduos geneticamente predispostos a dermatite atópica (DA), já que as mutações genéticas não são suficientes para manifestar sinais clínicos (OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2012).

A epiderme se inicia na camada basal (figura 1), onde a proliferação celular progressivamente da origem a camada espinhosa, granulosa até o

estrato córneo, a camada mais externa, onde tem sido descrito os defeitos na barreira cutânea (AGRAWAL; WOODFOLK, 2014).

## EPIDERMIS



**Figura 1** – Representação da composição celular da epiderme. Nota-se que o estrato córneo é a camada mais externa da composição e as células de langerhans compõem o sistema imune. Adaptado de: *BLANPAIN; FUCHS, 2009*

A função da barreira cutânea nos mamíferos é mantida pelos lipídios epidérmicos. Tais lipídios são detentores de um papel importante na diferenciação, estruturação e funcionamento da epiderme (SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, 1996; INMAN et al., 2001).

Os lipídeos epidérmicos constituem o estrato córneo, também composto por ceramidas, colesterol, sulfato de colesterol, ésteres de ácidos graxos de colesterol, ácidos graxos livres e esfingosina (SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, 1996; INMAN et al., 2001).

Os corneócitos são células achatadas que representam o estágio final da diferenciação dos queratinócitos. Durante sua formação, corpos lamelares presentes no estrato granuloso, são fundamentais no fornecimento de lipídios e das enzimas necessárias para uma maior diferenciação e descamação final da epiderme. Os lipídios fornecidos pelos corpos lamelares são organizados para formar as lamelas lipídicas extracelulares que ajudam a prevenir a perda de água interna e limitam a penetração de material exógeno (alérgenos), além de dar uma maior flexibilidade à barreira lipídica (CORK et al., 2006; HIGHTOWER; MARSELLA; FLYNN-LURIE, 2010).

### **2.2.2 Alterações na Barreira Epidérmica**

As anomalias da barreira lipídica são responsáveis pelo aumento do contato de alérgenos com células epidérmicas do sistema imunológico, levando a uma resposta Th2 (OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2012). A interrupção da função da barreira altera a concentração relativa destes lipídios e resultar em um aumento de perda de água transepidérmica (SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, 1996; INMAN et al., 2001). Essas disfunções na barreira têm sido demonstradas em estudos preliminares em cães atópicos, utilizando a microscopia eletrônica (OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2012).

Um estudo, realizado por Marsella et al. (2010), teve como objetivo avaliar e comparar a estrutura da barreira epidérmica de cães atópicos em relação a cães saudáveis, por meio da microscopia eletrônica. Sendo assim, o estudo demonstrou a presença de graves mudanças focais, que incluíam desorganização das lamelas lipídicas, aumento da largura entre corneócitos, corpos lamelares dentro de corneócitos, além de grandes quantidades de lipídeos amorfos intercelulares nos animais atópicos. Como conclusão, o autor demonstrou que a estimulação alérgica acentua as anomalias estruturais de cães atópicos, enquanto que cães normais não são afetados.

Outro estudo com cães atópicos da raça beagle, mensurou a quantidade de perda de água transepidérmica em áreas específicas do corpo, demonstrando

menor perda de água em tronco e dorso e maior perda de água em pálpebras, dobras flexurais, axilas, mento, região inguinal, porção distal de membros e pavilhão auricular (HIGHTOWER; MARSELLA; FLYNN-LURIE, 2010), locais esses, considerados pelo consenso, onde os cães com DA apresentam mais lesões (OLIVRY; SOUSA, 2001)

Um estudo realizado por CORK et al., 2006, em pacientes humanos demonstrou a presença de um distúrbio na maturação dos corpos lamelares caracterizado por uma diminuição na liberação de ácidos graxos, lipídios, enzimas e componentes do estrato córneo, culminando em redução na função da barreira cutânea nesses pacientes.

Sabe-se atualmente que, em humanos, a integridade da barreira cutânea pode ser avaliada por métodos não invasivos como, por exemplo, a mensuração da perda de água transepidermica (TEWL). A mensuração da TEWL tem se apresentado como um método adequado para avaliar indiretamente a função da barreira lipídica. Um estudo realizado por Corneigliani et al. (2012) mostrou uma diferença significativa da TEWL entre cães saudáveis e cães com dermatite atópica. Além disso, a TEWL foi menor em cães atópicos cuja doença estava em remissão devido ao tratamento. Estes dados provavelmente estão diretamente relacionados com as anormalidades lipídicas encontradas na barreira epidérmica de cães atópicos. É postulado que a diminuição de lipídios da epiderme pode levar a um aumento dos valores da TEWL (INMAN et al., 2001; CORK et al., 2006).

### **2.2.3 Filagrina**

Além da composição lipídica, outro componente da barreira cutânea, a filagrina, tem sido relatada como uma das mais importantes proteínas necessárias para a queratinização adequada da pele, responsável por facilitar a diferenciação terminal da epiderme e a formação da barreira. Esta estrutura evita a perda de água da epiderme e também impede a entrada de alérgenos, substâncias químicas tóxicas e microrganismos infecciosos (JUNGERSTED et al., 2010).

Uma mutação na porção C do gene da filagrina é um dos fatores de risco confirmados para o desenvolvimento de dermatite atópica em humanos, devido a uma perda da função da barreira (CARDILI et al., 2013). Essas mutações pioram significativamente a barreira da pele e aumentam o risco de sensibilização alérgica (NEMOTO-HASEBE et al., 2009; VAN DEN OORD; SHEIKH, 2009).

As citocinas Th2, que estão presentes nas lesões agudas da dermatite atópica, foram relacionadas por regular negativamente a expressão da filagrina, com impacto adicional sobre a função da barreira da pele (HOWELL et al., 2007; CORNEGLIANI et al., 2012).

A relação entre a inflamação e a barreira cutânea é muito alta e complexa, sendo estes dois aspectos mais inter-relacionados do que se pensava inicialmente (VESTERGAARD C, HVID M, JOHANSEN C, KEMP K, DELEURAN B, 2012). Embora seja evidente que algumas citocinas possam suprimir a expressão da filagrina em queratinócitos normais, não se sabe ainda se a expressão da filagrina pode ser estimulada por queratinócitos a partir de lesões da pele na atopia humana. Um estudo utilizando uréia tópica em voluntários normais mostrou aumento da expressão de mRNA de filagrina, mas nenhuma medição da proteína foi realizada (GRETHER-BECK et al., 2012).

### ***2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DAC***

Acredita-se que a deficiência na composição lipídica da epiderme seja responsável por permitir uma maior infiltração de antígenos (SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, 1996; DEBOER; MARSELLA, 2001). Uma vez que este tenha adentrado a epiderme e feito contato com células de Langerhans, ocorre o recrutamento de linfócitos T (WHITE, 1998), denominados linfócitos T ativados, podendo então produzir diferentes citocinas. Quando ocorre produção de IL-4, induz à uma resposta Th2, produzindo citocinas como IL-4 e IL-13, em maior quantidade. Quando há diferenciação para IL-12, ocorre uma resposta Th1, com maior produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ) (GERSHWIN, 2001).

Na fase aguda da doença observa-se uma predominância da resposta Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, e IL-31. Contudo na fase

crônica a resposta está ligada aos macrófagos e citocinas do tipo Th1, como IL-2, IL-12 e INF-  $\gamma$  (CZARNOWICKI; KRUEGER; GUTTMAN-YASSKY, 2014; OLIVRY et al., 2015)

As citocinas do tipo Th2 podem também fazer ligações com células B, se diferenciando em plasmócitos, que induzem a produção de imunoglobulinas E (IgE) específicas ao alérgeno que provocou a resposta imune. Essas IgEs alérgeno específicas se aderem a membrana dos mastócitos. Quando um novo contato com o mesmo alérgeno acontece, ocorre a ligação desses aos receptores das IgEs, provocando degranulação dos mastócitos e liberação de diversos mediadores inflamatórios, sobretudo histamina, heparina e serotonina (GERSHWIN, 2001) que estimulam, através da ativação da fosfolipase A2, a cascata inflamatória do ácido araquidônico (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013). A ativação dessa via leva à formação de tromboxano, leucotrienos e prostaglandinas, eficazes indutores da inflamação (GERSHWIN, 2001).

A inflamação crônica da pele tem papel fundamental no desencadeamento das manifestações clínicas, mais comumente o prurido e lesões cutâneas, causando também alterações na barreira cutânea (EYERICH; NOVAK, 2013). A combinação de mediadores pré-inflamatórios e dos mediadores do ácido araquidônico procede com o surgimento dos sinais de inflamação, como eritema, edema e prurido (WHITE, 1998).

Podemos ressaltar que o aumento de IL-31, citocina do perfil Th2, está relacionado com o desenvolvimento de prurido grave, traumatizando a pele no ato de coçar, o que agrava ainda mais a deficiência da barreira (RAAP et al., 2008).

A interleucina-31 (IL-31) é uma citocina envolvida em doenças da pele tais como a DA pruriginosa, como demonstrada em pesquisas com humanos. Esta parece ser produzida por linfócitos do tipo Th2 e ativada por linfócitos cutâneos que, por sua vez, constituem uma importante fonte desta citocina (GONZALES et al., 2013). Segundo (LEUNG, 2011) elevadas quantidades de imunoglobulinas E (IgE) e células Th2 podem ser encontradas em lesões agudas da dermatite atópica.

No tecido cutâneo a IL-31 se liga a um receptor heterodimérico constituído por um receptor alfa de interleucina-31 (IL-31RA) e um receptor beta de oncostatina M (OSMR). Os componentes do receptor de IL-31RA e OSMR são co-expressos nos queratinócitos e monócitos, ativados na presença de processo inflamatório. Estudos anteriores sugerem que esses receptores, IL-31RA e OSMR, estão envolvidos nos mecanismos pruriginosos da DA (RAAP et al., 2008; NOBBE et al., 2012).

A expressão da IL-31 é considerada maior em lesões pruriginosas em relação às não pruriginosas, sendo também maior em lesões não pruriginosas do que na pele integra de pacientes saudáveis (SONKOLY et al., 2006).

(DILLON et al., 2004; TAKAOKA et al., 2005) clonaram IL-31 e a injetaram, por via subcutânea, em ratos e relataram que houve uma superexpressão da mesma, que levou ao desenvolvimento de vários sinais característicos, os quais incluíram aumento de infiltrado inflamatório na pele, prurido grave, alopecia e lesões de pele causadas pelo trauma da coceira.

## **2.4 CÉLULAS TRONCO**

Desde a descoberta das células tronco (CT) em 1950 e a posterior identificação e caracterização das células tronco mesenquimais (CTM), inúmeras pesquisas e informações foram geradas a respeito das aplicabilidades biológicas, voltadas principalmente para área da saúde (M et al., 2012).

Estas células têm propriedades imunológicas excepcionais e tem sido relatada notável capacidade regenerativa e antiinflamatória (ALVES et al., 2017). Devido ao potencial de diferenciação em multilinhagens, potencial proliferativo e propriedades imunossupressoras, as CTM constituem uma excelente ferramenta potencial na medicina regenerativa e nas terapias genéticas e imunomoduladoras (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; SI et al., 2011).

A capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora da CTM pode ser fundamental no restabelecimento de condições localizadas ou sistêmicas, a fim

de promover a cura e regeneração tecidual (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013). Entre os tecidos conhecidos por terem células tronco na vida pós-natal, a medula óssea foi intensamente estudada, por anos, como fonte tanto de células tronco hematopoéticas (CTH), quanto de células tronco mesenquimais (CTM), cujas duas linhagens celulares formam um sistema cooperativo, em que as CTM, também conhecidas como células do estroma medular, estão relacionadas à manutenção de um microambiente de preservação das CTH (ALVES et al., 2017).

Além da medula óssea, as CTMs estão localizadas em outros tecidos, tais como: tecido adiposo, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, fígado e tecidos fetais (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006). Há inúmeros estudos relatando a existência de células tronco multipotentes também presentes no cérebro, coração, dentes, pele, fígado, folículos capilares e muitos outros tecidos e órgãos, dando origem a outros tipos de células seu tecido de origem (KUMAR; SINGH, 2006).

O tecido adiposo, em sua fração de estroma vascular, também contém CTM, além de células T reguladoras, as células precursoras endoteliais, adipócitos e macrófagos M2 (RIORDAN et al., 2009). Estas células derivadas de tecido adiposo estaminal apresentam propriedades imunomoduladoras semelhantes aos da CTM derivadas de medula óssea (KANG et al., 2008).

Na veterinária, os locais mais comuns para obtenção de CT são a medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical, em que o número de células isoladas a partir destes tecidos pode variar (WEBSTER et al., 2012). A concentração de CTM também pode variar, pois esta decresce com a idade. Com isso foi concluído que o maior número de CTM é encontrado em neonatos (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006).

Quanto ao local de recuperação das CTM devido à relativa facilidade de obtenção, a utilização clínica favoreceu o uso das CTM de medula óssea e do tecido adiposo, em que antes de qualquer terapia com células tronco é crucial a sua caracterização por um conjunto de marcadores funcionais ou fenotípicos específicos. Porém, não há critérios de caracterização uniformes disponíveis para CTM caninos até agora e poucos estudos são voltados para esta linha de

pesquisa (DE BAKKER et al., 2013). Em contrapartida, já é possível observar que o aumento da utilização terapêutica de CT resultou em métodos científicos de coleta, análise, processamento e armazenamento dessas células, com mínima lesão à célula e a sua diferenciação, em que a expansão celular, biorreatores e engenharia de tecidos são utilizados extensivamente para melhorar a dose celular e resultado com o emprego desta (MANKIKAR, 2010).

Apesar da forma inócua de coleta de CTM favorecer seu uso autólogo, a possibilidade de terapia alogênica acaba ampliando as perspectivas terapêuticas com esse tipo celular, por reduzir o tempo de espera do paciente pelo tratamento, uma vez que a cultura de CTM já estaria estabelecida, além de tornar desnecessária a colheita destas em paciente em estado desfavorável (MONTEIRO, BETÂNIA SOUZA; NETO; CARLO, 2009).

Estudos apontam os efeitos benéficos de CTM no tratamento de uma variedade de condições clínicas, incluindo a osteoartrite, lesões de tendão e DA em animais domésticos, bem como em lesões induzidas no sistema músculo esquelético e algumas doenças do sistema nervoso (WEBSTER et al., 2012).

As CTM foram utilizadas em modelos pré-clínicos para engenharia de tecidos de osso, cartilagem, músculos, estroma da medula, tendão, gordura e outros tecidos conjuntivos, em que estes materiais mostram-se uma considerável promessa para o uso na reconstrução de tecidos mesenquimais danificados ou doentes (CAPLAN, 2007). Houve também uma melhoria dramática no conhecimento das propriedades imunossupressoras de células estaminais em vários tipos de células imunitárias (MANKIKAR, 2010).

Em humanos, a medicina regenerativa é nova e promissora, sendo a terapia com células tronco vista como alternativa para diferentes doenças, tais como a diabetes juvenil, a esclerose lateral amiotrófica, paralisia cerebral, acidente vascular cerebral, lesão da medula espinal, infarto do miocárdio, doença do enxerto contra o hospedeiro, doença de Crohn, reparação da cartilagem do menisco e doença de Parkinson (MANKIKAR, 2010; CAPLAN, 2007).

É proposto que o benefício da CTM é reproduzido pelos fatores de crescimento, parácrinos e de imunomodulação que ela produz. O rápido progresso na área de medicina regenerativa realça a importância na abordagem e no conhecimento da biologia da pele paralelamente ao uso clínico e terapêutico das CT (KHOSROTEHRANI, 2013).

As CT da epiderme têm um papel crucial na manutenção da homeostase do tecido, garantindo a manutenção e reparação celular da mesma, incluindo tecido interfolicular, folículos pilosos e glândulas sebáceas, proporcionando novas células para substituir volume tecidual perdido após alguma perda ou lesão (BLANPAIN; FUCHS, 2009).

A facilidade de coleta, propagação e uso da CTM na terapia de condições traumáticas, isquêmicas e imunomediadas na pele estão em destaque (HARMAN, 2013). Em caso de danos traumáticos e isquêmicos, a aplicação direta no tecido lesionado auxiliando a regeneração e cicatrização, já em doenças mediadas pelos sistemas imunológicos, tais como lúpus, a administração sistêmica (via intravenosa) é capaz de modular o sistema imunológico (HARMAN, 2013).

Em medicina, a utilização de terapias celulares com CTM está em ascensão nas cirurgias reparadoras, principalmente de defeitos estéticos, como cicatrizes de acne, envelhecimento cutâneo, entre outros (ZORZANELLI et al., 2017), além de poderem ajudar na cicatrização de feridas, reparar tecidos danificados e revigorar o crescimento da pele, cabelo, unhas e membranas mucosas (DAHL, 2012).

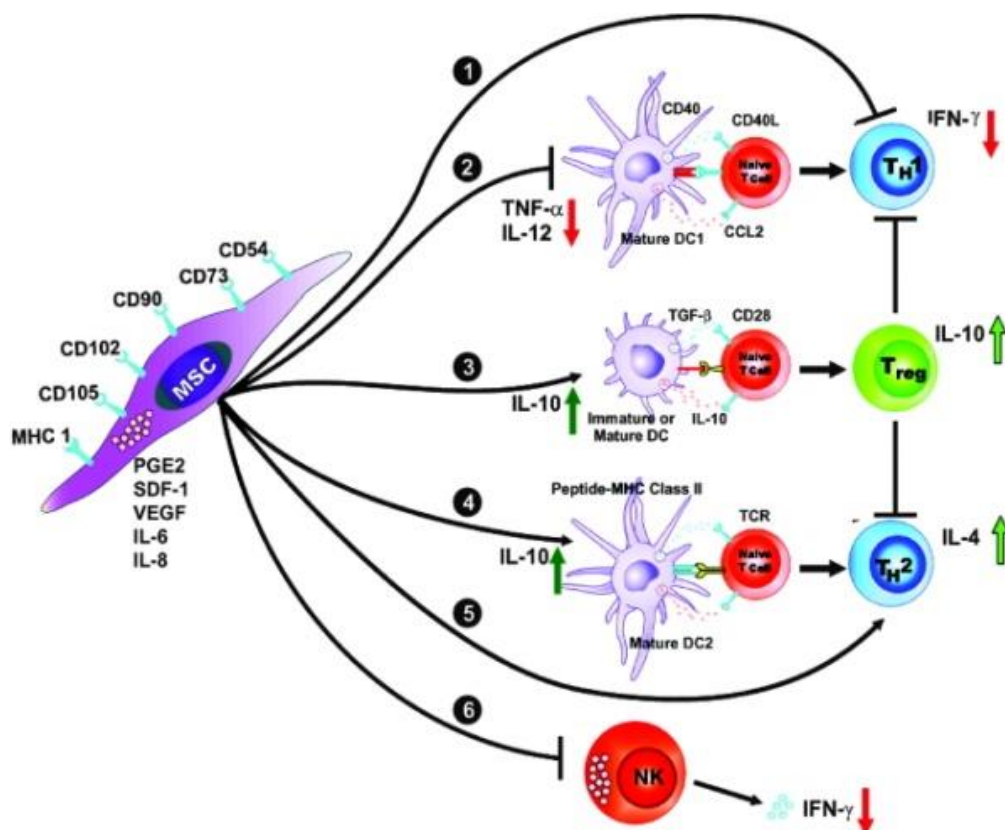
Quando transplantadas para um local lesionado, a CTM pode se incorporar ao tecido danificado, reparando e regenerando o tecido através da secreção de citocinas (WEBSTER et al., 2012). As CTM regulam negativamente a produção de citocinas inflamatórias e bloqueiam a ativação de células T, além de poderem estimular as células locais residentes, como queratinócitos e células progenitoras, a proliferar, migrar e reparar lesões de pele e doenças (DAHL, 2012; HARMAN, 2013) .

## **2.5 CTM NA IMUNOMODULAÇÃO E PROCESSOS INFLAMATÓRIOS**

As CTM são parcialmente definidas pela sua capacidade de se diferenciar em tecidos, incluindo osso, cartilagem e tecido adiposo *in vitro*, mas é seu efeito trófico, ação parácrina e funções imunomoduladoras que podem ter o maior impacto terapêutico *in vivo* (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

Essa capacidade de imunomodulação da CTM reforça o seu potencial terapêutico, não só autólogo, mas também de receptores alogênicos (WEBSTER et al., 2012). Progressos significativos foram feitos na compreensão dos mecanismos de *feedback*, processos bioquímicos e metabólicos associados com a resposta as CTM (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013). Mas, o mecanismo molecular que medeia a imunossupressão e imunomodulação pelas CTM, necessita de mais investigações (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; RASMUSSEN, 2006).

Em estudo de AGGARWAL & PITTENGER (2005) com células humanas alogênicas é proposto um modelo para a compreensão de tal processo (Figura 2), evidenciando a CTM como possível componente ativo na modulação da inflamação, indução de tolerância e redução de complicações de alotransplantes tais como rejeição e a doença do exerto versus hospedeiro.



**FIGURA 2.** Mecanismos de ação das CTM proposto pelo modelo de AGGARWAL & PITTENGER (2005) apontam o efeito imunomodulador mediado pela interação com as células do sistema imunológico (células dendríticas (DC), vias 2-4; células natural killer (NK), via 6) e sistemas de imunidade adaptativa (células T, vias 1 e 5). As CTM inibem a secreção de TNF- $\alpha$  e a promoção da secreção de IL-10 afetando o estado de maturação das DC e as suas propriedades funcionais, como resultado há um desvio da resposta imunológica para um fenótipo de anti-inflamatório e de tolerância do mesmo. Em alternativa, quando estão presentes num microambiente inflamatório, eles inibem a secreção de IFN- $\gamma$  a partir de células TH1 e NK e aumentam a secreção de IL-4 a partir de células TH2, promovendo, assim, uma mudança de TH1  $\rightarrow$  TH2.

Foi mostrado que a CTM é capaz de suprimir a ativação de células T *in vivo* e *in vitro*, modulando a função imune das principais populações celulares envolvidos no reconhecimento e na eliminação aloantígeno, incluindo células apresentadoras de antígeno, as células T e células natural killer (RASMUSSON, 2006).

Além disso, *in vitro*, essas células alteram o padrão de citocinas pelas células T helper, diminuem a liberação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon e inibem a proliferação de células T após

estímulo por aloantígenos e agentes mitogênicos, impedindo o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos (AGGARWAL; PITTEGER, 2005).

O contato célula-célula faz com que as CTM produzam diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos e de macrófagos, fator estimulador de crescimento de macrófago e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas, envolvidas no processo de inflamação (AGGARWAL; PITTEGER, 2005; MONTEIRO; NETO; CARLO, 2009).

## **2.6 CÉLULAS TRONCO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA (CTMDA)**

Em um estudo piloto, foi avaliado a eficácia de CTMDA autógenas no tratamento da dermatite atópica canina, em que fora administrado uma dose única de 1,3 milhões de células por quilo, intravenosa, em cinco cães atópicos, porém não houve melhora significativa nos sinais clínicos e nível de prurido, avaliados ao longo de 10 semanas após a aplicação (HALL et al., 2010).

Posteriormente, em 2013, um estudo utilizando CTMDA no tratamento de cães atópicos, comprovou que a secreção de citocinas imunomoduladoras IL10 e TGFb1 após aplicação diária por 3 dias consecutivos, refletiu em uma melhora significativa dos sinais clínicos nestes pacientes. JEE et.al. (2013),

Estas citocinas imunomodulam a inflamação e inativaram IL6, INFC, iNOS, eNOS e Nox4 capazes induzir os sinais patológicos da DA. Adicionalmente, estas citocinas protegem os queratinócitos contra a degeneração apoptótica, o que sugere um potencial uso terapêutico para pacientes com DA humanos e caninos (JEE et al., 2013).

Entretanto, a perspectiva do uso de CTM em terapias para dermatopatias é promissora, porém são necessários mais estudos para sustentarem uma resposta clínica favorável e estabelecimento de protocolos, em que a parceria em pesquisas da medicina e da veterinária tende a proporcionar uma melhoria na saúde de cães e de homens (HALL et al., 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS:**

Avaliar a utilização da terapia com células tronco mesenquimais na resposta inflamatória de cães diagnosticados com dermatite atópica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ✓ Avaliar a eficácia do transplante endovenoso de células-tronco mesenquimais na resposta clínica dos cães com dermatite atópica por meio da análise do grau de prurido e sinais dermatológicos.
- ✓ Avaliar a segurança do método de aplicação do transplante endovenoso de células-tronco mesenquimais e seus possíveis efeitos colaterais em cães.
- ✓ Avaliar a resposta inflamatória do transplante endovenoso de células-tronco mesenquimais por meio da dosagem sérica de citocinas
- ✓ Relacionar o uso de CTM com as respostas TH1 e TH2 por meio da dosagem sérica de citocinas.

## **Capítulo II**

# **Trabalho científico**

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista *Veterinary Dermatology* (ISSN: 1365-3164; *Eur Soc of Vet Dermatology*). Site da revista: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3164](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3164) As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3164/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3164/homepage/ForAuthors.html)

## **Análise imunoenzimática sérica de cães atópicos submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais – avaliação do perfil inflamatório**

**Beatriz R. Berbel\*, Bianca M. Gonçalves\*, José F. A. Ribeiro, Luiz H. A Machado\*.**

\* Department of Veterinary Clinics, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

**Correspondence:** Luiz Henrique A. Machado, MSc, Ph.D, Department of Veterinary Clinics, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences São Paulo State University (UNESP), Campus Botucatu. Email: [henrique@fmvz.unesp.br](mailto:henrique@fmvz.unesp.br).

**Resumo** – A dermatite atópica canina (DAC) apresenta uma complexa relação entre a inflamação e a barreira cutânea. Algumas citocinas têm sido relacionadas com o padrão inflamatório, sinais clínicos e a gravidade da doença. Sabe-se que as células-tronco mesenquimais (CTM) regulam negativamente a produção de citocinas inflamatórias, reproduzindo seu benefício pelos seus fatores de imunomodulação. O rápido progresso na medicina regenerativa realça a importância de mais estudos para o estabelecimento de protocolos para essa terapia promissora.

**Objetivos** – Avaliação da escala do grau de prurido e de lesões em cães com dermatite atópica submetidos ao transplante CTM. Realizou-se também a mensuração sérica dos níveis de citocinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) para avaliação do perfil da resposta inflamatória nesses cães.

**Animais** – Foram utilizados seis cães diagnosticados com dermatite atópica.

**Métodos** – Ensaio clínico randomizado simples cego controlado com placebo. Realizou-se 3 aplicações de placebo e de CTM consecutivamente em um intervalo de 15 dias. As amostras coletadas para o grupo placebo foram no dia

zero (antes da primeira aplicação), 15, 30 e 45 (após 3 aplicações), e para o grupo tratado nos dias 45 (antes da primeira aplicação de CTM), 60, 75 e 90 (após as 3 aplicações de CTM).

**Resultados** – A avaliação clínica segundo o escore de prurido e o escore de CADESI-4 das lesões secundárias a dermatite atópica apresentou significativa melhora após as aplicações das CTM, quando comparadas com a fase de placebo. Não houve alteração no perfil inflamatório de citocinas testado neste modelo de estudo.

**Conclusão** – perante o modelo proposto, embora a terapia com CTM não tenha alterado o perfil inflamatório, demonstrou-se eficaz na redução dos sinais clínicos segundo a escala de CADESI-4 e escore de prurido de Rybníček.

## INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença de pele geneticamente predisposta a inflamação e prurido, cujas manifestações clínicas estão associadas a anticorpos IgE, mais frequentemente relacionados a alérgenos ambientais (1).

Tem sido proposta uma nova perspectiva sobre a importância da disfunção da barreira lipídica da epiderme em indivíduos geneticamente predispostos a dermatite atópica (DA), já que as mutações genéticas não são suficientes para manifestar sinais clínicos (1,2).

As anomalias da barreira lipídica podem ser responsáveis pelo aumento do contato de alérgenos com células epidérmicas do sistema imunológico, levando a uma resposta Th2 (1,2). A interrupção da função da barreira pode alterar a concentração relativa destes lipídios e resultar em um aumento de perda de água transepidérmica (3,4). Essas disfunções na barreira têm sido demonstradas em estudos preliminares em cães atópicos, utilizando a microscopia eletrônica (1,2).

Além da composição lipídica, outro componente da barreira cutânea, a filagrina, tem sido relatada como uma das mais importantes proteínas

necessárias para a queratinização adequada da pele, responsável por facilitar a diferenciação terminal da epiderme e a formação da barreira. Esta estrutura evita a perda de água da epiderme e também impede a entrada de alérgenos, substâncias químicas tóxicas e organismos infecciosos (5,6).

Acredita-se que a deficiência na composição lipídica da epiderme seja responsável por permitir uma maior infiltração de antígenos(3,7). Uma vez que este tenha adentrado a epiderme e feito contato com células de Langerhans, ocorre o recrutamento de linfócitos T (8), denominados linfócitos T ativados, podendo então produzir diferentes citocinas. Quando ocorre produção de IL-4, induz à uma resposta Th2, produzindo citocinas como IL-4 e IL-13, em maior quantidade. Quando há diferenciação para IL-12, ocorre uma resposta Th1, com maior produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ) (9).

Na fase aguda da doença observa-se uma predominância da resposta Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, e IL-31. Contudo na fase crônica a resposta está ligada aos macrófagos e citocinas do tipo Th1, como IL-2, IL-12 e INF-  $\gamma$  (10,11). Ressaltando que o aumento de IL-31, citocina do perfil Th2, está relacionado com o desenvolvimento de prurido grave, traumatizando a pele no ato de coçar, o que agrava ainda mais a deficiência da barreira (12,13). A relação entre a inflamação e a barreira cutânea é muito alta e complexa, sendo estes dois aspectos mais inter-relacionados do que se pensava inicialmente (14).

As células-tronco mesenquimais regulam negativamente a produção de citocinas inflamatórias e bloqueiam a ativação de células T, além de poderem estimular as células locais residentes, como queratinócitos e células progenitoras, a proliferar, migrar e reparar lesões de pele e doenças (15,16). Por conseguinte, é proposto que o benefício da CTM é reproduzido pelos fatores de crescimento, parácrinos e de imunomodulação que eles produzem, em que o rápido progresso na área de medicina regenerativa realçam a importância na abordagem e conhecimento da biologia da pele paralelamente ao uso clínico e terapêutico das CT (17).

O uso de CTM em ensaios clínicos aumenta e têm evocado a promessa em estratégias mais avançadas e melhores tratamentos para uma variedade de doenças, dentre elas a dermatite atópica canina (18 – 20).

A perspectiva do uso de CTM em terapias para dermatopatias é promissora, porém são necessários mais estudos para sustentarem uma resposta clínica

favorável e estabelecimento de protocolos, em que a parceria em pesquisas da medicina e da veterinária tende a proporcionar uma melhoria na saúde de cães e de homens (21).

## **Material e métodos**

Todos os procedimentos realizados nos animais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ Unesp Botucatu.

### **Animais e critérios de inclusão**

Foram utilizados seis cães de rotina hospitalar diagnosticados com dermatite atópica, sem distinção de sexo, raça, porte ou idade.

O diagnóstico de dermatite atópica, além da exclusão dos diferenciais para alergopatias, como a dermatite alérgica a ectoparasitas, escabiose, hipersensibilidade alimentar, baseou-se no histórico e exame clínico. Os cães selecionados apresentavam pelo menos 6 dos 8 critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010) (Quadro 1). Foi proibido o uso de terapias orais concomitantes durante o período do estudo. Em alguns casos durante o período do estudo, foi utilizada terapia tópica com xampu a base de clorexidine e miconazol, pomadas antibióticas, emolientes e hidratantes.

**QUADRO 1.** Critérios adaptados de Favrot (2010)

<p>Início dos sinais clínicos antes de três anos de idade</p> <p>Cães habitam normalmente ambientes internos</p> <p>Prurido responsivo a corticosteroides</p> <p>Prurido como sinal clínico inicial (prurido alesional)</p> <p>Patas torácicas afetadas</p> <p>Pavilhões auriculares afetados</p> <p>Margens de orelhas não afetadas</p> <p>Área lombo sacra não afetada</p> <p>A presença de cinco dos critérios acima determina sensibilidade de 85% e especificidade de 79% para se diferenciar dermatite atópica canina de cães com prurido crônico recorrente sem dermatite atópica canina.</p> <p>Caso de opte por seis critérios a especificidade aumenta para 89%, mas com queda de sensibilidade para 58%</p>
--

**Critérios de exclusão**

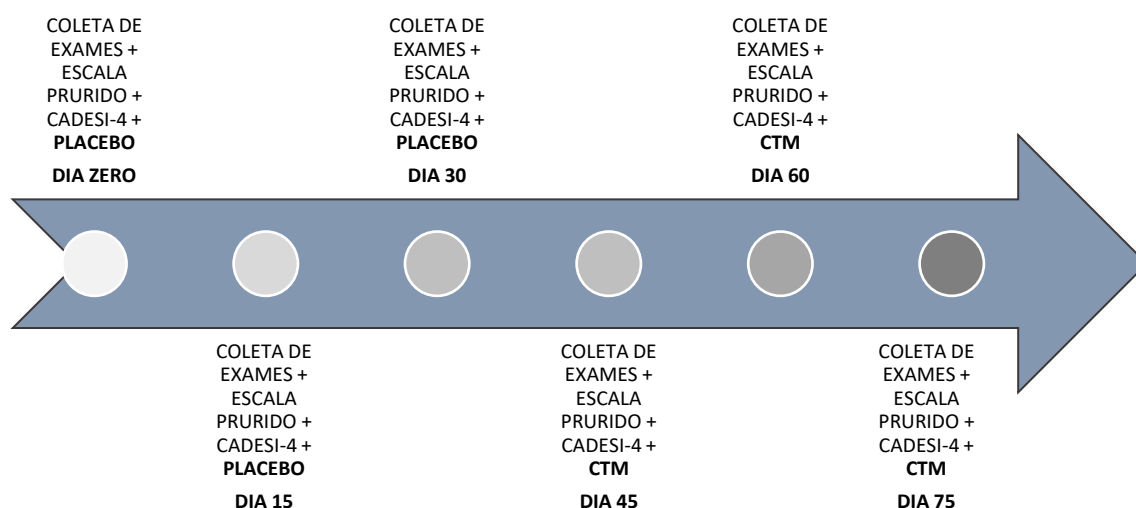
Foi estabelecido como critério de exclusão animais com histórico de doenças hormonais, autoimunes, imunomediadas, neoplasias, epilepsia, histórico prévio de anafilaxia, intervenções cirúrgicas recentes e prenhez.

Todos os cães foram submetidos aos exames dermatológicos complementares para descartar outras possíveis causas de dermatopatias. Dentre os exames, o escovado do pelame, tricograma, impressão em fita de acetato, citologia, exame parasitológico por raspado cutâneo, fluorescência por lâmpada de Wood e cultura fúngica quando necessário.

Os exames dermatológicos e colheita das amostras foram realizados pelo serviço de Dermatologia Veterinária da FMVZ-UNESP campus Botucatu.

## Delineamento experimental

Foram coletadas amostras sanguíneas e de urina para exames laboratoriais e realizado avaliações clínicas dermatológicas e de prurido nos momentos: M0, M1, M2, M3, M4, e M5 que correspondem aos dias zero, 15, 30, 45, 60 e 75. Os dias zero, 15 e 30 correspondem aos momentos de aplicação de placebo. Os dias 45, 60 e 75 correspondem aos momentos de aplicação de CTM (Figura 1).



**FIGURA 1.** Delineamento experimental

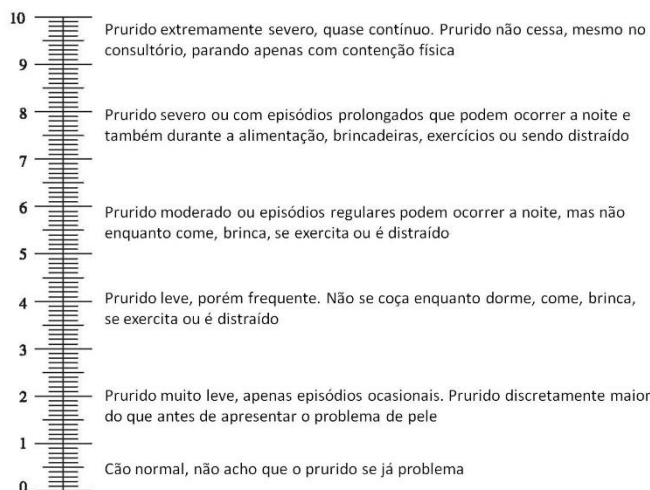
## Colheita das amostras

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção venosa jugular, totalizando 10mL de sangue, distribuídos em tubos de EDTA para realização do hemograma completo, e tubos com gel separador para o perfil bioquímico sérico (ureia, creatinina, ALT, FA, GGT, proteína total, globulina e albumina) e posterior armazenamento de soro sanguíneo a  $-196^{\circ}\text{C}$  para dosagens de citocinas. O

exame de urina tipo I foi coletado por micção natural ou sondagem uretral. Todas as colheitas das amostras e os processamentos dos exames complementares foram realizados no serviço hospitalar.

### Avaliação clínica do prurido

O grau de prurido foi mensurado em todos os atendimentos e datas das coletas das amostras segundo o escore de prurido de Rybníček et al. (2008) (Figura 2). Questionamos os tutores dos animais para que atribuíssem uma nota de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e posteriormente para que mostrasse em que grau da escala de escore de prurido de Rybníček et al. (2008) o animal se encaixava (prurido esclarecido), onde na escala apresentava apenas as classificações, sem as numerações.



**FIGURA 2.** Escore de prurido. Adaptado de Rybníček et al. (2008).

### Avaliação clínica dermatológica

As informações relativas às lesões tegumentares comuns da dermatite atópica como eritrodermia, liquenificação, prurido, escoriações e alopecia auto-induzida foram anotadas em uma tabela de escore denominada CADESI-4 (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) (Tabela 1) elaborada e validada por Olivry et al. (2014).

A escala CADESI-4 inclui a avaliação das 20 regiões do corpo mais afetadas em cães com dermatite atópica, avaliando lesões agudas e crônicas. Nesta validação três lesões (eritema, liquenificação e alopecia/escoriação) foram pontuadas quanto a gravidade em 0 (nenhuma), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (severo) em cada região. A CADESI-4 teve validade, confiabilidade e sensibilidade à mudança de forma satisfatória. Sendo mais simples de usar e mais rápida de administrar do que a sua versão anterior (22).

**TABELA 1.** Escala CADESI-04 de avaliação de lesões de pele. Interpretação dos pontos: Cães Normais: < 10, dermatite atópica em remissão: < 10, dermatite atópica leve: 10-34, dermatite atópica moderada: 35-59, dermatite atópica severa: 60 pontos. Adaptado de OLIVRY et al., 2014.

CADESI -04 (ICADA)			Erite ma	Liquenificação	Escoriação e/ou Alopecia	TOTAL
Área Perilabial (combinação direita e esquerda)		1				
Pavilhão Auricular	Esquerdo	2				
	Direito	3				
Axila	Esquerda	4				
	Direita	5				
Membros Torácicos (lados combinados: dorsal e palmar)	Esquerdo	6				
	Direito	7				
Membros Pélvicos (lados combinados: dorsal e plantar)	Esquerdo	8				
	Direito	9				
Flexura do Cotovelo	Esquerda	10				
	Direita	11				
Metacarpo Palmar (do carpo até os coxins)	Esquerdo	12				
	Direito	13				
Flancos	Esquerdo	14				
	Direito	15				
Áreas Inguinais (virilhas)	Esquerda	16				
	Direita	17				
Abdômen		18				
Períneo (a partir da vulva/escroto até o ânus)		19				
Cauda Ventral		20				
Grau de cada local e cada tipo de lesão: Nenhuma: 0; Leve: 1; Moderado: 2; Severo: 3			<b>Total de pontos: (20X3X3=180)</b>			

## **Aplicação do placebo e das células-tronco mesenquimais**

As amostras de células-tronco mesenquimais foram cedidas pela empresa REGENERA®. O Kit de aplicação fornecido continha os criotubos com as células tronco, tubos de propileno com solução para descongelamento, tubos de propileno com solução de lavagem e pipetas Pasteur estéreis e descartáveis. Após recebimento pela empresa, as CTM foram estocadas em nitrogênio líquido para conservação até o momento da utilização.

Nos dias das aplicações as células armazenadas em criotubos foram descongeladas em banho maria a 37°C durante 2 minutos e transferidas imediatamente para a solução de descongelamento (fornecida pela empresa) para serem centrifugadas a 1200 RPM por 5 minutos. Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e adicionado à solução de lavagem (fornecida pela empresa), onde foi homogeneizado delicadamente até a dissolução do precipitado, para ser centrifugado novamente a 1200 RPM por mais 5 minutos. Após a segunda centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e adicionado à solução de lavagem (fornecida pela empresa) e homogeneizado do mesmo modo até que o precipitado se dissolvesse e fosse para centrifugação a 1200 RPM durante 5 minutos. Após mais uma vez desprezar o sobrenadante, foi adicionado 2ml de solução fisiológica para a aplicação. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril foi realizada a homogeneização até dissolução. Como recomendado pela empresa, as CTM foram prontamente aplicadas após o preparo, pois não podem permanecer mais que 10 minutos na solução fisiológica para que a qualidade celular não seja comprometida, bem como o resultado da terapia. A aplicação foi realizada com uma seringa de 3ml e agulha 40cmX12cm, para evitar danos nas células, e aplicada lentamente pela via endovenosa. A via de escolha foi a veia cefálica.

Nos dias zero, 15 e 30 foram aplicados 2ml de solução fisiológica endovenosa para a fase de placebo. Nos dias 45, 60 e 75 foram aplicados 2ml de solução fisiológica + CTM.

## Dosagem sérica de citocinas

Os níveis séricos das citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF $\alpha$  foram determinados utilizando os Kits comerciais *Nori® Canine ELISA Kit DataSheet* (Genorise, Philadelphia, PA, USA) e da citocina IFN-gamma utilizando-se dos Kits comerciais *RayBio® Canine IFN-gamma ELISA Kit* (Raybiotech, Norcross, GA, USA) seguindo as recomendações dos fabricantes. A avaliação da quantidade de citocinas foi mensurada como se segue: 100 $\mu$ L de anticorpos específicos para cada citocina (anticorpos de captura) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato adicionados as placas de alta afinidade (Maxisorp-Nunc) e incubados "overnight" a 4°C. Após lavagem dos poços, estes foram neutralizados com uma solução proteica pobre em gordura (leite desnatado) para saturação dos sítios de ligação. As amostras dos sobrenadantes foram diluídas em PBS-Tween contendo 3% de leite desnatado e incubadas por 2 horas à 4°C. Após nova lavagem, foram adicionados aos poços 100 $\mu$ L de anticorpo biotilado anti-citocina e incubados por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, foram adicionados aos poços o conjugado avidina-peroxidase (1 hora) e a reação é revelada com a adição de solução contendo peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina (OPD). Após 15 minutos de incubação em local protegido de iluminação, a reação é bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, procedendo-se a leitura da reação em um leitor de ELISA com filtro de 492nm.

## Análise Estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todas as comparações entre os momentos foram feitas utilizando a técnica da análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes

complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (23) quando a variável apresentava aderência à distribuição normal de probabilidades e, na ausência desta, teste de comparações múltiplas de Dunn (24). Os dados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todos os gráficos foram realizados com a ajuda do software GraphPad prism 5.1.

## **Resultados**

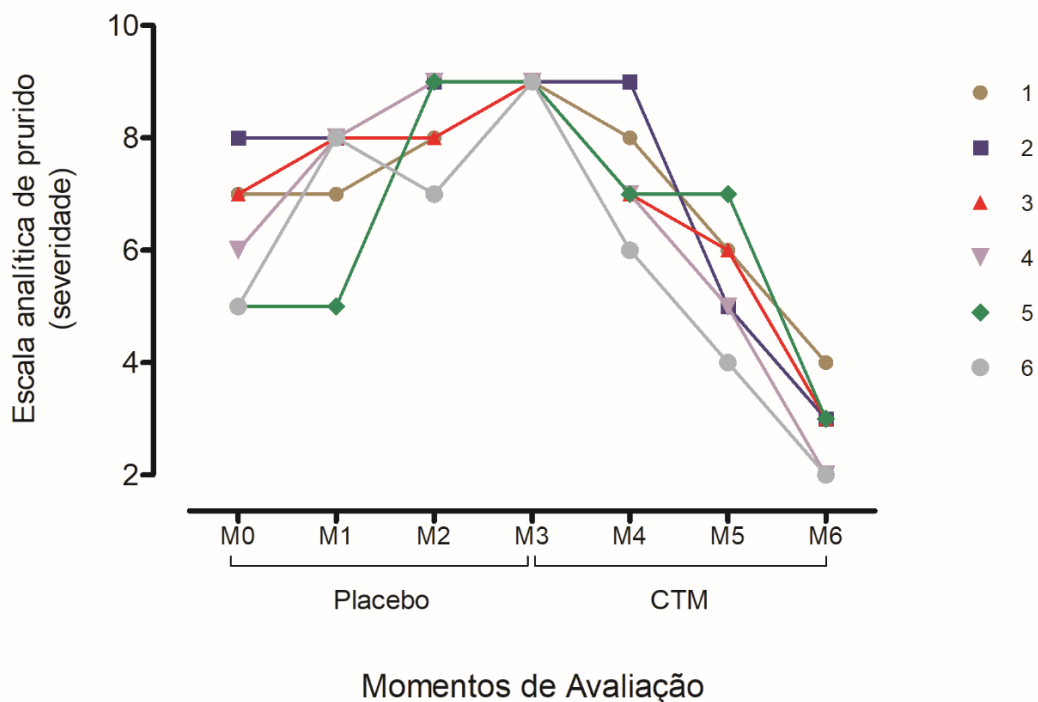
### **Avaliação hematológica, bioquímica sérica e urinálise**

Não houve significância estatística em nenhum momento entre os grupos placebo e tratamento nos exames de hemograma, bioquímica sérica e urinálise.

### **Avaliação clínica segundo escala de prurido e score de CADESI-04.**

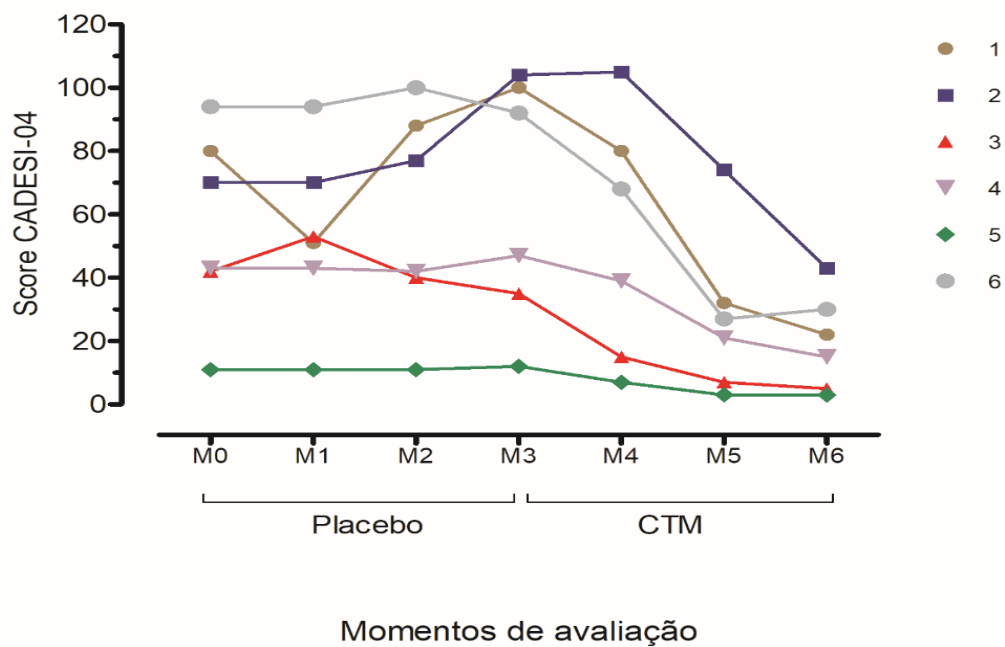
Ao final do estudo (M6), os animais tratados apresentaram importante redução do score de prurido ( $p < 0,01$ , ANOVA) quando comparados ao estado inicial (M0) e também quando comparados aos momentos de placebo (M1, M2 e M3) com os momentos de tratamento (M4, M5 e M6) (Gráfico 1). Cabe ressaltar que no momento do placebo, entre M1 e M3, os animais aumentaram de forma significativa o seu score de prurido ( $p < 0,05$ , ANOVA), reduzindo significativamente após o início do tratamento ( $p < 0,01$ , ANOVA) a partir dos momentos (M4, M5 e M6).

**GRÁFICO 1.** Avaliação do prurido conforme Escala de Rubyniack. Mensurações do nível de prurido nos respectivos tempos de experimentação. Valores dispostos em média, dados com letras diferentes indicam diferença estatística.  $P < 0,05$  para grupo Placebo e  $P < 0,01$  para o grupo CTM; ANOVA com bonferroni.



Além da melhoria do prurido, os animais nos momentos de tratamento apresentaram reduções significativas no score de CADESI-04 ( $p < 0,01$ ; ANOVA), em cada momento de mensuração (Gráfico 2). Comparando com o grupo placebo, os animais tratados diferem de forma significativa em relação a redução do escore.

**GRÁFICO 2.** Avaliação das lesões conforme Score de CADESI-04. Valores dispostos em média, dados com letras diferentes indicam diferença estatística.  $P < 0,05$ ; ANOVA com bonferroni.



Pode-se observar também a melhora das lesões dermatológicas mensuradas pelo CADESI-04, por meio das fotos exemplificadas de antes e depois de dois animais do experimento (Figura 3 e Figura 4).



**FIGURA 3.** No momento inicial do estudo, M0 (fotos A e C), observamos alopecia, eritema, hiperpigmentação, hiperqueratose e lignificação em região pélvica de membros pélvicos (A) e eritema, hipotricose e hiperqueratose em região periocular (C). No momento final do experimento, M6 (fotos B e D) observa-se melhora das alterações cutâneas nas mesmas regiões citadas acima.

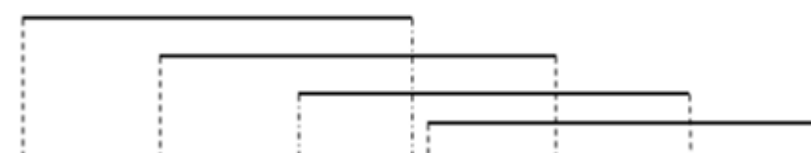


**FIGURA 4.** No momento inicial M0, observamos eritema, escoriação, alopecia e hiperqueratose em região periocular (A) e hipotricose, eritema e em região ventral e membros pélvicos (C). No momento final do experimento, M6 (fotos B e D) observa-se melhora das alterações cutâneas nas mesmas regiões citadas acima.

### Avaliação da mensuração sérica das citocinas

Foram dosadas as citocinas IL1, IL4, IL6, IL10, IL17, IL31, IFN, TNF (Tabela 2). Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos momentos avaliados, nem entre o grupo placebo e o grupo tratado.

TABELA 2. Múltiplas comparações entre todos os grupos (placebo e tratamento) e momentos (M0 a M6 correspondentes aos dias zero, 15, 30, 45, 60, 75 e 90), sendo todos considerados sem significância estatística ( $p > 0,05$ ).



	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6
IL-1	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
IL-4	33,58	31,25	<31,25	<31,25	<31,25	<31,25	<31,25
IL-6	<50	<50	<50	<50	51,3	57	53,9
IL-10	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
IL-17	<94	<94	<94	<94	<94	<94	<94
IL-31	68,1	73,6	65,8	77,5	66,6	62,8	71,0
IFN- $\gamma$	0,15	0,25	0,25	0,30	0,25	0,25	0,30
TNF- $\alpha$	81	82,7	89,8	75,5	66,7	90,7	64,2
	PLACEBO			TRATAMENTO			

### Avaliação da segurança das aplicações

Em relação a aplicação das células-tronco mesenquimais pela via endovenosa, observou-se reação em dois cães (Tabela 3).

**TABELA 3.** Relação dos momentos das aplicações de CTM com os sinais apresentados

Animal	Aplicação	Sintoma
1	M4	Anafilaxia aguda transitória – micção, depressão respiratória, hipotensão
	M4	Apatia
2	M5	Apatia
	M6	Sinais neurológicos – salivação, desequilíbrio, letargia e trismo

O segundo cão foi retirado do estudo devido à gravidade das reações apresentadas, e foi substituído por outro cão que se enquadrava nos critérios de seleção.

## Discussão

O uso de CTM pode desempenhar um importante papel imunomodulatório, principalmente melhorando o perfil de citocinas circulantes. Visando avaliar o impacto do uso deste tratamento no perfil inflamatório, realizamos dosagens séricas de interleucinas comumente envolvidas, visto que outros autores já relataram. Em seres humanos, sabe-se atualmente que a doença cursa com perfil multifatorial, principalmente envolvendo distúrbios na maturação queratolítica e respostas TH2, além de ativação adicional de respostas do tipo TH22, TH17/IL-23 e TH1, com produção de citocinas de acordo com a fase da doença. Sendo assim, reporta-se a importância do estadiamento do paciente (agudo ou crônico) para um tratamento multissistêmico individualizado e eficaz (27). Em cães, há a necessidade de seguirmos as , visto que os animais escolhidos para o estudo eram portadores de dermatite atópica crônica, resistentes ao tratamento convencional. Embora os sintomas clínicos tenham

melhorado, podemos associar a fase de doença em que os animais se encontravam com a possível ausência de redução nos padrões inflamatórios séricos, visto que o perfil de interleucinas permaneceu o mesmo tanto no início, período do placebo ou final do experimento. Cabe ressaltar que outros autores questionam o real envolvimento imunológico na patogênese da DAC canina. Um estudo recente publicado por (28), avaliou a eficácia do tratamento oral imunomodulador em cães atópicos, comparando sinais clínicos por CADESI-03 e perfil de citocinas pró-inflamatórias pela técnica RT-PCR em biópsias de pele. De acordo com o autor, os animais se beneficiaram clinicamente com tratamento, entretanto, os níveis de expressão de mRNA das interleucinas avaliadas não apresentaram redução significativa, em qualquer fase de avaliação. Nosso estudo entra em concordância com o descrito anteriormente, visto que os animais se beneficiaram clinicamente mesmo não apresentando redução dos níveis séricos de citocinas. Apesar da ausência de uma resposta favorável nos níveis séricos de citocinas, as mesmas mantiveram-se constantes durante todo o experimento, não apresentando variação.

O uso de células-tronco neste modelo estudado, aplicado pela via endovenosa, foi eficaz em reduzir significativamente os sintomas clínicos associados a doença, comprovados pela melhora na escala analítica de escore de prurido por Rybniček e pelo CADESI-04, em discordância do relatado por HALL et al., 2010 (21), que não observou benefícios significativos quando avaliados pelos mesmos métodos, após o transplante em cães atópicos.

Sabe-se que há um importante envolvimento imunológico na patogênese da doença, embora não seja completamente elucidado esse mecanismo em cães, quanto em seres humanos (28).

Dos seis animais utilizados para o estudo, dois deles apresentaram reações adversas a aplicação. Embora possamos associar esta reação com algumas particularidades do próprio animal: tamanho (1-4 kg) e anatomia respiratória (braquicefálico), não há estudos suficientes na literatura que comprovem a segurança da aplicação em diversos grupos e a necessidade de padronização de doses/kg. Alguns estudos sugerem que a aplicação, quando feita pela via subcutânea ou intramuscular, em cães atópicos podem trazer menores riscos de anafilaxia (29).

A intenção de um estudo simples cego com fase de placebo proposta neste estudo foi a redução de vieses relacionados a terapia combinada, visto que antes das três aplicações de CTM-TA, os mesmos animais passaram por um período composto pelas três aplicações de placebo. Ademais, no início do tratamento propriamente dito (M3), podemos detectar que os animais estavam em situação de piora clínica e foram melhorando progressivamente até o final do estudo com melhora visual relatada pelos tutores a partir da segunda aplicação.

Contudo, pode-se inferir que três aplicações quinzenais de CTMs-TA foram eficazes em produzir resposta terapêutica benéfica nos animais atópicos, mesmo na ausência de outras terapias.

**Referências:**

1. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol.* 2010;21(3):233–48.
2. Corneigliani L, Vercelli A, Sala E, Marsella R. Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: A comparative preliminary study. *Vet Dermatol.* 2012;23(1).
3. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN C. *Dermatologia de pequenos animais.* INTERLIVROS, editor. Rio de Janeiro; 1996. p. 1130.
4. Inman AO, Olivry T, Dunston SM, Monteiro-Riviere NA, Gatto H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet Pathol.* 2001;38(6):720–3.
5. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Mar 19;38:441. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1767>
6. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Høgh JK, et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* [Internet]. 2010;65(7):911–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x>
7. DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): The relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81(3–4):239–49.
8. WHITE PD. atopia. In: BICHARD, S. J.; SHERDING RG, editor. *Manual saunders: clínica de pequenos animais.* são paulo: Roca; 1998. p.

664–675.

9. Gershwin LJ. Immunoglobulin E-mediated hypersensitivity in food-producing animals. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 2001;17(3):599–619. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30009-8)
10. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):411–7.
11. Czarnowicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: An evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2014;2(4):371–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2014.03.006>
12. RAAP, U.; WICHMANN, K.; BRUDER, M.; STANDER, S.; WEDI, B.; KAPP A. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis To. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(2):419–21.
13. Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: Overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2013;68(8):974–82.
14. Vestergaard C1, Hvid M, Johansen C, Kemp K, Deleuran B DM. Inflammation-Induced Alterations in the Skin Barrier Function: Implications in Atopic Dermatitis. 2012;96:77–80.
15. Harman RJ. Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Vet Dermatol*. 2013;24(1).
16. Dahl MV. Stem cells and the skin. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2012;11(4):297–306. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366134679;%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/jocd.12008;%5Cnhttp://sfx.ub.rug.nl:9003/sfx\\_local?sid=EMBASE&issn=14732130&id=doi:10.1111/jocd.12008&atitle=Stem+cells+and+the+skin&stitle=J](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366134679;%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/jocd.12008;%5Cnhttp://sfx.ub.rug.nl:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=14732130&id=doi:10.1111/jocd.12008&atitle=Stem+cells+and+the+skin&stitle=J)
17. Khosrotehrani K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: Why and what for? *Exp Dermatol*. 2013;22(5):307–10.

18. Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR, Vesey G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J*. 2012;60(5):265–72.
19. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2011;10(1):93–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.005>
20. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol / Polish Acad Sci Polish Histochem Cytochem Soc* Bobis, S, Jarocha, D Majka, M Mesenchymal stem cells Charact Clin Appl *Folia Histochem Cytobiol* 44, 215–230 . 2006;44(4):215–30.
21. Hall MN, Rosenkrantz WS, Hong JH, Griffin CE, Mendelsohn CM. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Ther* [Internet]. 2010;11(2):E1-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957613>
22. Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, Hill PB. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol*. 2014;25(2):77–86.
23. JOHNSON, R.A.; WICHERN DW. Applied multivariate statistical analysis. 6ed. New jersey: Prentice -Hall; 2007. 773p p.
24. ZAR JH. Biostatistical analysis. 5ed. New jersey: Prentice -Hall; 2009. 994p p.
27. Brunner PM, Guttman-Yassky E, Leung DYM. The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2017;139(4):S65–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.011>
28. White AG, Santoro D, Ahrens K, Marsella R. Single blinded, randomized, placebo-controlled study on the effects of ciclosporin on

cutaneous barrier function and immunological response in atopic beagles. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2018;197(February):93–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.02.001>

29. Enciso. Treatment of canine atopic dermatitis with autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells *Date*. 2015;(December).

## **Capítulo III**

## 5. CONCLUSÕES

- O uso de CTM conferiu benefícios clínicos aos animais, avaliados pela melhora no score CADESI-04 e também na escala de prurido analítica.
- O uso de CTM não promoveu alterações nos perfis séricos de citocinas pró-inflamatórias.
- Podemos concluir que 3 aplicações com intervalos quinzenais de células tronco mesenquimais foram eficazes em produzir resposta terapêutica benéfica nos cães atópicos, mesmo na ausência de outras terapias.

## REFERENCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.

AGRAWAL, R.; WOODFOLK, J. A. Skin Barrier Defects in Atopic Dermatitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 5, p. 433, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11882-014-0433-9>>.

ALVES, E. G. L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I. R.; BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; REZENDE, C. M. de F. B. M. new paradigma 2006. pd. Isolamento E Cultivo De Células Tronco Mesenquimais Extraídas Do Tecido Adiposo E Da Medula Óssea De Cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, n. 0, p. 1–14, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-68912017000100315&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912017000100315&lng=pt&tlng=pt)>.

ANTUNES, A. A.; SOLÉ, D.; CARVALHO, V. O.; BAU, A. E. K.; KUSCHNIR, F. C.; MALLOZI, M. C.; MARKUS, J. R.; SILVA, M. G. N. E.; PIRES, M. C.; MELLO, M. E. E. A.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; SARINHO, E. S. C.; CHONG-NETO, H. J.; RUBINI, N. P. M.; SILVA, L. R. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 2, 2017. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2526-5393.20170019>>.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 207–217, 2009.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia histochemica et cytobiologica /**

**Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society**. Bobis, S., Jarocho, D. & Majka, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.* **44**, 215–230, v. 44, n. 4, p. 215–230, 2006.

CARDILI, R. N.; MELO, J. M.; ARRUDA, L. K.; ROSELINO, A. M.; MORENO, A. S.; CASTRO, A. P. M. Dermatite atópica e filagrina : restaurando barreiras para o controle da doença. *Braz J Allergy Immunol*, v. 1, n. 5, p. 239–242, 2013.

CORK, M. J.; ROBINSON, D. A.; VASILOPOULOS, Y.; FERGUSON, A.; MOUSTAFA, M.; MACGOWAN, A.; DUFF, G. W.; WARD, S. J.; TAZI-AHNINI, R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 118, n. 1, p. 3–21, 2006.

CORNEGLIANI, L.; VERCELLI, A.; SALA, E.; MARSELLA, R. Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: A comparative preliminary study. *Veterinary Dermatology*, v. 23, n. 1, 2012.

CZARNOWICKI, T.; KRUEGER, J. G.; GUTTMAN-YASSKY, E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: An evolving story with important clinical implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, v. 2, n. 4, p. 371–379, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2014.03.006>>.

DAHL, M. V. Stem cells and the skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 11, n. 4, p. 297–306, 2012. Disponível em: <[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366134679;%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/jocd.12008;%5Cnhttp://sfx.ub.ru.g.nl:9003/sfx\\_local?sid=EMBASE&issn=14732130&id=doi:10.1111/jocd.12008&atitle=Stem+cells+and+the+skin&stitle=J](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L366134679;%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/jocd.12008;%5Cnhttp://sfx.ub.ru.g.nl:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=14732130&id=doi:10.1111/jocd.12008&atitle=Stem+cells+and+the+skin&stitle=J)>.

DE BAKKER, E.; VAN RYSSSEN, B.; DE SCHAUWER, C.; MEYER, E. Canine mesenchymal stem cells: State of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. *Veterinary Quarterly*, v. 33, n. 4, p. 225–233,

2013.

DEBOER, D. J.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): The relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 239–249, 2001.

DILLON, S. R.; SPRECHER, C.; HAMMOND, A.; BILSBOROUGH, J.; ROSENFELD-FRANKLIN, M.; PRESNELL, S. R.; HAUGEN, H. S.; MAURER, M.; HARDER, B.; JOHNSTON, J.; BORT, S.; MUDRI, S.; KUIJPER, J. L.; BUKOWSKI, T.; SHEA, P.; DONG, D. L.; DASOVICH, M.; GRANT, F. J.; LOCKWOOD, L.; LEVIN, S. D.; LECIEL, C.; WAGGIE, K.; DAY, H.; TOPOUZIS, S.; KRAMER, J.; KUESTNER, R.; CHEN, Z.; FOSTER, D.; PARRISH-NOVAK, J.; GROSS, J. A. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. **Nature Immunology**, v. 5, n. 7, p. 752–760, 2004.

EYERICH, K.; NOVAK, N. Immunology of atopic eczema: Overcoming the Th1/Th2 paradigm. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 8, p. 974–982, 2013.

GERSHWIN, L. J. Immunoglobulin E-mediated hypersensitivity in food-producing animals. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 17, n. 3, p. 599–619, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30009-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30009-8)>.

GONZALES, A. J.; HUMPHREY, W. R.; MESSAMORE, J. E.; FLECK, T. J.; FICI, G. J.; SHELLY, J. A.; TEEL, J. F.; BMMERT, G. F.; DUNHAM, S. A.; FULLER, T. E.; MCCALL, R. B. Interleukin-31: Its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

GREYER-BECK, S.; FELSNER, I.; BRENDEN, H.; KOHNE, Z.; MAJORA, M.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; RODRIGUEZ-MARTIN, M.; TRULLAS, C.; HUPE, M.; ELIAS, P. M.; KRUTMANN, J. Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 6, p. 1561–

1572, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.42>>.

HALL, M. N.; ROSENKRANTZ, W. S.; HONG, J. H.; GRIFFIN, C. E.; MENDELSON, C. M. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 11, n. 2, p. E1-14, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957613>>.

HARMAN, R. J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

HIGHTOWER, K.; MARSELLA, R.; FLYNN-LURIE, A. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 88–95, 2010.

HOWELL, M. D.; KIM, B. E.; GAO, P.; GRANT, A. V.; BOGUNIEWICZ, M.; DEBENEDETTO, A.; SCHNEIDER, L.; BECK, L. A.; BARNES, K. C.; LEUNG, D. Y. M. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 150–155, 2007.

INMAN, A. O.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S. M.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GATTO, H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 6, p. 720–723, 2001.

JAEGER, K.; LINEK, M.; POWER, H. T.; BETTENAY, S. V.; ZABEL, S.; ROSYCHUK, R. A. W.; MUELLER, R. S. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: A comparison of five locations in three continents. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 118–122, 2010.

JEE, M. K.; IM, Y. B.; CHOI, J. I.; KANG, S. K. Compensation of cATSCs-derived TGF $\beta$ 1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 2, p. 1–13, 2013.

JUNGERSTED, J. M.; SCHEER, H.; MEMPEL, M.; BAURECHT, H.; CIFUENTES, L.; HØGH, J. K.; HELLGREN, L. I.; JEMEC, G. B. E.; AGNER, T.; WEIDINGER, S. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. **Allergy**, v. 65, n. 7, p. 911–918, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x>>.

KANG, J. W.; KANG, K.-S.; KOO, H. C.; PARK, J. R.; CHOI, E. W.; PARK, Y. H. Soluble Factors–Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 4, p. 681–694, 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2007.0153>>.

KHOSROTEHRANI, K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: Why and what for? **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 307–310, 2013.

KUMAR, S.; SINGH, N. P. Review Article Stem cells : A new paradigm. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 12, n. 27, p. 4–10, 2006.

LEUNG, M. B. D. Atopic Dermatitis: A Disease of Altered Skin Barrier and Immune Dysregulation. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 233–246, 2011.

M, P.-S. R.; J, R.-E. J.; A., S.; A., A.; E, P.; O., M. Celulas troncales mesenquimales Biologia caracterizacion y futuras aplicaciones en salud y produccion de especies pecuarias Parte I.pdf. 2012.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; CARLOTTI, D.-N. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 3, p. 239–248, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x>>.

MONTEIRO, BETÂNIA SOUZA; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. Del. Células-tronco mesenquimais. p. 1–8, 2009.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: Environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 45, n. 11, p. e54-16, 2013. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.94>>.

NEMOTO-HASEBE, I.; AKIYAMA, M.; NOMURA, T.; SANDILANDS, A.; MCLEAN, W. H. I.; SHIMIZU, H. Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 3, p. 682–689, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.280>>.

NOBBE, S.; DZIUNYCZ, P.; MÜHLEISEN, B.; BILSBOROUGH, J.; DILLON, S. R.; FRENCH, L. E.; HOFBAUER, G. F. L. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. **Acta Dermatovenereologica**, v. 92, n. 1, p. 24–28, 2012.

NUTTALL, T.; URI, M.; HALLIWELL, R. Canine atopic dermatitis - what have we learned? **The Veterinary record**, v. 172, n. 8, p. 201–207, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23436599>>.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. A.; MUELLER, R. S.; NUTTALL, T.; PRÉLAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 3, p. 233–248, 2010.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. A.; MUELLER, R. S.; NUTTALL, T.; PRÉLAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0514-6>>.

OLIVRY, T.; SOUSA, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): General principles of therapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 311–316, 2001.

RAAP, U.; WICHMANN, K.; BRUDER, M.; STANDER, S.; WEDI, B.; KAPP, A. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 2, p. 419–421, 2008.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells.

**Experimental Cell Research**, v. 312, n. 12, p. 2169–2179, 2006.

RIORDAN, N. H.; ICHIM, T. E.; MIN, W.-P.; WANG, H.; SOLANO, F.; LARA, F.; ALFARO, M.; RODRIGUEZ, J.; HARMAN, R. J.; PATEL, A. N.; MURPHY, M. P.; LEE, R. R.; MINEV, B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29, 2009. Disponível em: <<http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-7-29>>.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. **Dermatologia de pequenos animais**. [s.l: s.n.]

SI, Y. L.; ZHAO, Y. L.; HAO, H. J.; FU, X. B.; HAN, W. D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 93–103, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.08.005>>.

SILVESTRE SALVADOR, J. F.; ROMERO-PÉREZ, D.; ENCABO-DURÁN, B. Atopic dermatitis in adults: A diagnostic challenge. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 27, n. 2, p. 78–88, 2017.

SONKOLY, E.; MULLER, A.; LAUERMA, A. I.; PIVARCSI, A.; SOTO, H.; KEMENY, L.; ALENIUS, H.; DIEU-NOSJEAN, M. C.; MELLER, S.; RIEKER, J.; STEINHOFF, M.; HOFFMANN, T. K.; RUZICKA, T.; ZLOTNIK, A.; HOMEY, B. IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 411–417, 2006.

TAKAOKA, A.; ARAI, I.; SUGIMOTO, M.; YAMAGUCHI, A.; TANAKA, M.; NAKAIKE, S. Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, n. 2, p. 180–181, 2005.

VAN DEN OORD, R. A. H. M.; SHEIKH, A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: Systematic review and meta-analysis. **BMJ (Online)**, v. 339, n. 7712, p. 86–88, 2009.

VESTERGAARD C1, HVID M, JOHANSEN C, KEMP K, DELEURAN B, D. M. Inflammation-Induced Alterations in the Skin Barrier Function: Implications in Atopic Dermatitis. v. 96, p. 77–80, 2012.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639–648, 2004.

WEBSTER, R. A.; BLABER, S. P.; HERBERT, B. R.; WILKINS, M. R.; VESEY, G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 60, n. 5, p. 265–272, 2012.

WHITE, P. D. atopia. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. (Ed.). **Manual saunders: clínica de pequenos animais**. são paulo: Roca, 1998. p. 664–675.

ZORZANELLI, R. T.; SPERONI, A. V.; MENEZES, R. A.; LEIBING, A. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 129–144, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-59702017000100129&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702017000100129&lng=pt&tlng=pt)>.