

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 alérgico-inflamatória 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. Conclui-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 its 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 interleukins il-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31, TNF- α , IFN- γ and Filaggrin, 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 pseudintermedius*, 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

para o núcleo. Com a junção de ligantes extracelulares, proteínas intracelulares de JAK, que se associam com receptores de citocinas do tipo I / II, tornam-se ativados e fosforilam as proteínas STAT, que dimerizam e translocam então para o núcleo diretamente regular a expressão gênica (DAMSKY e KING, 2016).

Atividades de enzima JAK1 desempenham um papel central na sinalização de citocinas que participam da transdução do sinal de muitas citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruridogênicas implicadas na dermatite atópica, incluindo interleucina (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31 (COSGROVE et al., 2013).

O inibidor de JAK, oclacitinib (Apoquel®; Zoetis Inc., Florham Park, NJ, EUA), é aprovado em vários países para o controle/tratamento do prurido associado com dermatite alérgica e o controle/tratamento da DA em cães acima de 12 meses de idade. Oclacitinib é uma terapia-alvo que inibe seletivamente caminhos chaves que levam a estimulação do prurido e a inflamação cutânea, particularmente através da inibição da JAK-1 que sinaliza a interleucina-31, citocina que induz prurido em cães (LITTLE et al., 2015). Apoquel® é comercializado no Brasil desde 2016.

Novos conhecimentos sobre a patogênese tem um impacto direto sobre como diagnosticar e tratar a DA canina e são a base de novos tratamentos que chegarão em nossas prateleiras farmacêuticas no futuro (DEBOER, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da dermatite atópica

A DA é uma doença muito comum em crianças. Sua ocorrência é considerada em 15 a 25% das crianças no mundo ocidental (ORANJE et al., 2016). Já o estudo da ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) refere, em nosso meio, prevalência de 8,2% entre crianças de 6 a 7 anos e de 5% entre adolescentes de 13 a 14 anos (FORTE, 2015).

A segunda espécie mais acometida é a canina, com uma prevalência de 3 a 15% da população geral de cães, o que representa entre 3% e 58% dos cães levados ao veterinário devido a dermatopatias (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

A maioria dos cães atópicos começa a manifestar sinais entre os seis meses e os três anos de idade (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Não se conhece qualquer predisposição relativa ao gênero. Em geral, o cão tem uma história de prurido, com ou sem infecções recorrentes, na pele e nas orelhas. Uma história de lacrimejamento, congestão ocular ou de espirros/rinorreia pode ser indicativa de uma conjuntivite ou de uma rinite atópica, respectivamente (OLIVRY et al, 2010).

Demonstrou-se que os cães com DA induzida por alimentos eram provavelmente mais novos (com menos de 1 ano, 46.5 versus 38.6%) ou mais velhos (com mais de 6 anos, 8.7 versus 3.8%) em comparação com cães com DA associado com alérgenos ambientais (BIZIKOVA et al., 2015).

Os sinais clínicos podem ser sazonais ou, mais comumente, não sazonais, ou não sazonal com exacerbação sazonal (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016), dependendo principalmente dos alérgenos envolvidos como fatores de desencadeamento da crise e do meio ambiente do animal doméstico (OLIVRY et al, 2010).

A maioria dos estudos concordou que o west highland white terrier (WHWT), labrador retriever, golden retriever, boxer, bulldog francês, cão pastor alemão e cocker spaniel representaram as raças de cães mais comumente afetadas. Suspeita-se que a popularidade regional de algumas raças particulares ou o fundo genético distinto em diferentes áreas geográficas afetem as

proporções de algumas raças nestes relatórios (BIZIKOVA et al., 2015). Uma publicação com foco em diferenças relacionadas a raças relatou que o Bulldog Francês e Shar-pei aparentam desenvolver DA mais precocemente do que outras raças (OLIVRY et al, 2010).

2.2 Imunopatogênese da dermatite atópica canina

DA canina é uma doença hereditária, na qual a interação com fatores ambientais influencia o risco de desenvolvimento da doença e sua manifestação clínica (BIZIKOVA et al., 2015). A sua patogênese é complexa e particularmente não bem compreendida, com fatores genéticos e ambientais envolvidos na determinação da susceptibilidade à doença clínica. Condições que contribuem para o desenvolvimento da DA incluem a disfunção da barreira epidérmica, infecção cutânea por bactérias (geralmente por *Staphylococcus pseudintermedius*) e leveduras (i.e. *Malassezia pachydermatis*), fatores psicogênicos e doenças de pele simultâneas (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

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).

Hipersensibilidade envolve a sensibilização imunológica de um indivíduo (homem ou animal) pela exposição repetida ao antígeno causador (alérgeno) ao longo do tempo. Um indivíduo sensibilizado pode, na posterior exposição ao alérgeno, reagir de forma excessiva ou inadequada imunologicamente, levando a patologia tecidual e alterações clínicas de doença alérgica ou hipersensibilidade. Os alérgenos envolvidos muitas vezes são substâncias ambientais onipresentes a que apenas indivíduos geneticamente suscetíveis irão reagir de forma inadequada (DAY, 2014). A sensibilização a alérgenos ambientais e/ou alérgenos de alimentos, fontes microbianas ou insetos podem levar à infiltração da pele por células inflamatórias, ativação de células residentes

e produção local de mediadores inflamatórios (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

Só herdar um genótipo de susceptibilidade não garante que um indivíduo vai desenvolver a doença alérgica. Atualmente, é muito claro que o ambiente e fatores de estilo de vida pessoal impactam fortemente na predisposição para a alergia. Exposição ao alérgeno pode ser geográfica (por exemplo, a distribuição global de plantas particulares e os pólenes; a influência climática sobre a distribuição de ectoparasitas) ou relacionada com o equilíbrio entre um estilo de vida dentro e fora de ambientes fechados (DAY, 2014).

O projeto alergia (PROAL) aponta como ordem de frequência dos aeroalérgenos: ácaros do pó doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*), pelos de animais, restos de baratas, polens (*Lolium perene*), gramíneas e os fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton sp.* e *Penicillium sp.*) (FORTE, 2015).

A “hipótese da higiene”, uma das discussões de maior impacto dentro da pesquisa sobre doenças alérgicas, procura explicar o fato de que a prevalência da doença alérgica (e autoimune) na população humana dos países desenvolvidos tem aumentado exponencialmente desde a década de 1960. Nas últimas cinco décadas, as pessoas vivem um estilo de vida cada vez mais domiciliado e 'higienizado' em torno de tecnologia moderna. Imunologicamente, acredita-se que estes efeitos afetam o número ou a função das células T regulatórias naturais, que são importantes na supressão de células T alérgeno-específicas ou antígeno-específicas que podem promover a doença alérgica ou autoimune (DAY, 2014).

Uma descoberta chave nos últimos 10 anos foi o papel fundamental das interações entre o sistema imune inato e a epiderme com substâncias ambientais durante a fase de indução da inflamação atópica. Exposição a estes agentes pode tanto proteger como desencadear ou exacerbar a inflamação atópica através da modulação da resposta imune inata (DAY, 2014).

Demonstrou-se que os queratinócitos são células ativas na imunidade inata com relações íntimas com as células de Langerhans epidérmicas. Provavelmente, os efeitos dependam do nível e do tempo de exposição e

ativação, bem como da presença de fatores concomitantes. Por sua vez, estas células podem ativar e influenciar o tipo e o curso da resposta das células do sistema imune adaptativa (BIZIKOVA et al, 2015).

Componentes do sistema imune inato (incluindo as células dendríticas, células de Langerhans e mastócitos) e queratinócitos interagem uns com os outros e com antígenos ambientais tanto durante as fases de indução como nas fases efetoras da inflamação atópica. As respostas destas células e fatores não celulares associados (como complemento e receptores de protease-ativado) aos estímulos ambientais influenciam todo o curso futuro da resposta imune a um determinado agente (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Até poucos anos, a visão tradicional patogênica da DA enfocava na interpretação de que seu desenvolvimento foi devido a alterações genéticas do sistema imunológico, levando a resposta imunológica anormal [por exemplo, maior alérgeno específico imunoglobulina E (IgE)] para alérgenos inócuos (teoria de 'dentro para fora'). Mais recentemente, uma teoria que enfoca o papel fundamental da barreira epidérmica tem sido proposta (teoria 'de fora para dentro'). A teoria de 'fora dentro' propôs que uma barreira de pele anormal em pacientes atópicos facilita a penetração de alérgenos (e micróbios) na epiderme, aumentando o seu contato e a exposição de células epidérmicas imunes. Essas teorias não são mutuamente exclusivas, e elas foram integradas em uma teoria mais abrangente (ou seja, teoria 'fora-dentro-fora') com base no modo de exibição que um defeito primário na barreira epidérmica leva a uma maior penetração de alérgenos e micróbios que superestimulam a imunidade local (inata e adaptativa). Tal estimulação excessiva provoca a liberação de mediadores inflamatórios que exacerbam a disfunção da barreira (SANTORO et al., 2015).

Anormalidades no metabolismo lipídico também podem influenciar a patogênese da DA canina por meio da produção de mediadores inflamatórios e por alteração de função da barreira epidérmica e apresentação de antígenos. No entanto, a falta de estudos controlados totalmente se opõe a definitiva interpretação destes dados (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Evidências indicam que as células e componentes não celulares do sistema imunitário inato e a epiderme podem desempenhar um papel crítico

durante a sensibilização e as fases efetoras da DA canina (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Anteriormente, muitos investigadores consideraram que estes eram apenas células efetoras. No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que essas células interagem com fatores ambientais e posteriormente 'montam o palco' para o desenvolvimento da sensibilização alérgica e da doença clínica.

Mastócitos e queratinócitos podem desempenhar papéis particularmente importantes através de seus locais críticos dentro da pele e sua capacidade de eliciar a produção de várias citocinas inflamatórias. Estas e outras células ajudam a montar uma intrincada teia de interações entre o ambiente, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. O resultado final dessas interações é a ativação dos linfócitos T e B. A função destes linfócitos é influenciada em parte por meio da ativação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

A teoria atualmente aceita para a patogênese da DA canina pode ser resumida da seguinte forma: na fase aguda da doença, pensa-se que os presumíveis defeitos da barreira epidérmica facilitam o contato dos alérgenos ambientais (e, possivelmente, de alérgenos microbianos) com as células imunológicas da epiderme. As células apresentadoras de antígenos epidérmicas capturam os alérgenos através das suas IgE específicas, migrando em seguida para a derme e para os nódulos linfáticos regionais. Os produtos microbianos e os mediadores inflamatórios derivados das células imunitárias ativam os queratinócitos que, por sua vez, liberam mais quimiocinas e citocinas. Os mastócitos dérmicos revestidos com IgE liberam histamina, proteases, quimiocinas e citocinas após o contato com os alérgenos (OLIVRY et al, 2010).

Numa fase inicial, ocorre um afluxo de granulócitos (neutrófilos e eosinófilos), de linfócitos T específicos para o alérgeno e de células dendríticas dérmicas. Ocorre o desgranulamento dos eosinófilos e a liberação de proteínas que induzem danos na derme e epiderme. Os linfócitos Th2 liberam citocinas que promovem a síntese de IgE e a sobrevivência de eosinófilos. Os agentes microbianos, os auto-traumatismos e os neuromediadores podem igualmente contribuir para a inflamação persistente das lesões cutâneas crônicas. Existe um ciclo contínuo de liberação de quimiocinas que conduz ao afluxo e a ativação de leucócitos e a liberação adicional de mediadores pró-inflamatórios. As falhas na

regulação negativa dos mecanismos pró-inflamatórios são seguidas por uma inflamação cutânea que se autoperpetua.

Apesar dos avanços nos conhecimentos acerca da patogênese da DA canina, ainda não foram identificados os mediadores que desencadeiam a sensação de prurido. É importante referir que a histamina não parece originar prurido nos cães, ao contrário do que acontece nos humanos e nos ratos (OLIVRY et al, 2010). Esses fatores são inter-relacionados e, para a maioria, não está claro se eles representam a principal causa ou um fenômeno secundário. Na figura 1, resume-se os fatores patogênicos responsáveis pela inflamação cutânea e prurido em cães com dermatite atópica e suas inter-relações (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

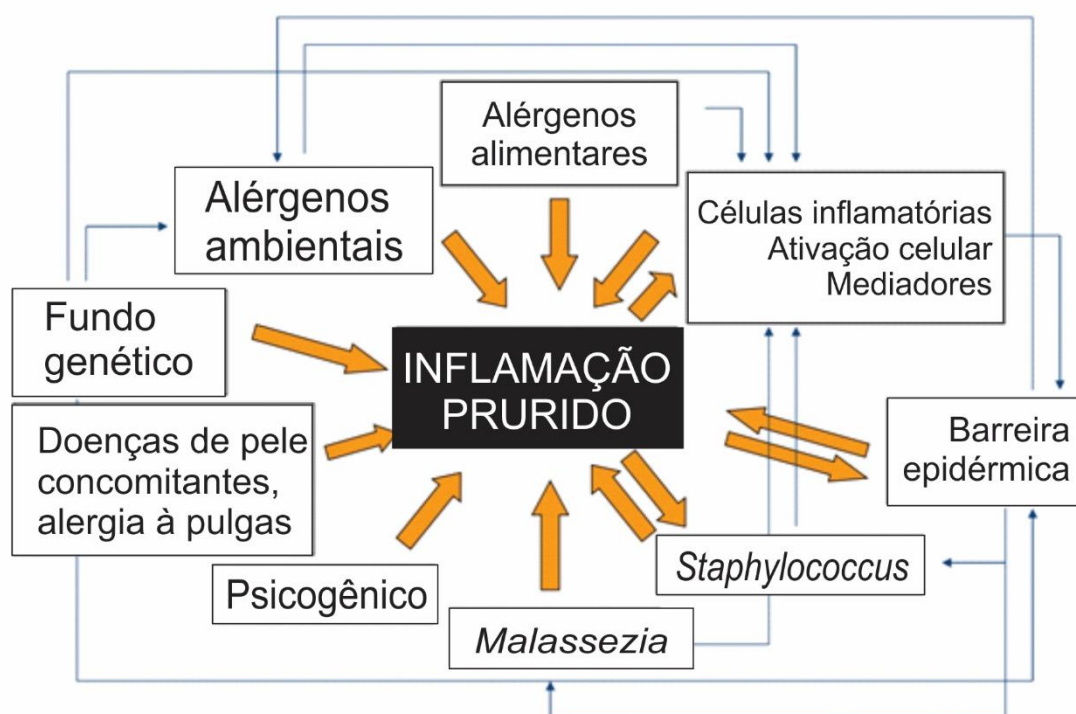


FIGURA 1: fatores patogênicos responsáveis pela inflamação cutânea e prurido em cães com dermatite atópica e suas inter-relações (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

IgG alérgeno-específico tem sido documentado em associação com doença clínica na DA em cães, mas ainda não há evidência de que os anticorpos deste isotipo tenham qualquer papel no desenvolvimento da doença. Apesar de IgG não poder ser excluída como um fator de patogenicidade em doença de pele

alérgica em cães, estudos continuam a apoiar o IgE como o anticorpo que por 'definição' está associado com a DA (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Com o desenvolvimento de novos métodos para avaliar a expressão genética, tornou-se claro que a DA canina não é completamente um fenômeno Th2, apesar de estarem envolvidas no desenvolvimento e na perpetuação da DA, particularmente nas fases iniciais e em lesões agudas. Em vez disso, hipersensibilidade cutânea é o resultado de um equilíbrio delicado entre uma variedade de tipos de respostas de células T e de mediadores inflamatórios, incluindo não só citocinas Th2, mas também T-helper 1 (Th1), que além de induzirem respostas imunes mediadas por células e, em certa medida, antagonizarem respostas Th2, também contribuem para o desenvolvimento da doença clínica e podem predominar em lesões crônicas; Th17 e citocinas reguladoras, bem como fatores de não citocinas (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Na figura 2, mostra-se um organograma com essas características.

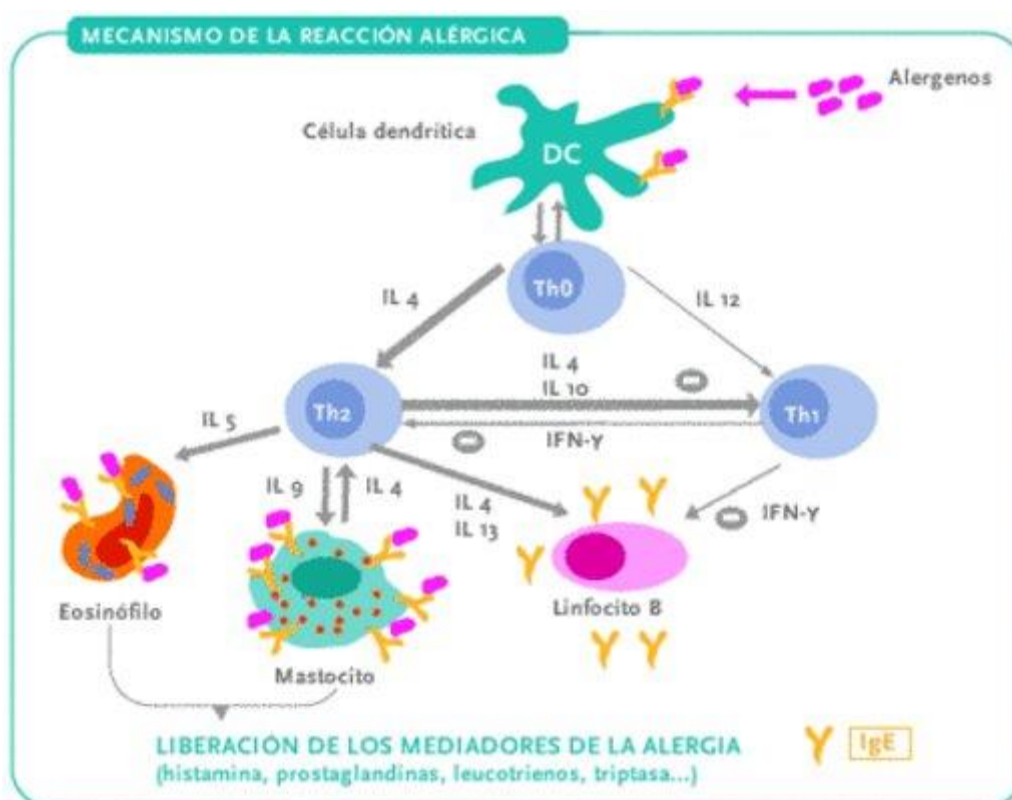


FIGURA 2: liberação dos mediadores de alergia na reação alérgica. Zoetis.

Enzimas da janus kinase (JAK) ativadas fosforilam domínios intracelulares do receptor de citocina, criando sites de encaixe para proteínas de sinalização, denominados STAT, que são membros dos transdutores de sinal e ativadores da família de transcrição (GONZALES et al, 2014). Em mamíferos, quatro famílias JAK de enzimas (JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina quinase 2) e sete transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6) são usados por mais de 50 citocinas e fatores de crescimento para mediar a sinalização intercelular (VILLARINO et al, 2015).

Enzimas JAK residem no citoplasma das células e seletivamente se associam com a porção proximal da membrana de variados receptores de citocinas do tipo I e II. Após a estimulação do receptor de citocinas dos complexos, ocorrem mudanças conformacionais na porção citoplasmática do receptor da citocina, causando a ativação de receptores associados aos JAKs (GONZALES et al, 2014).

Uma vez no receptor, STATs são fosforiladas pelas JAKs em um resíduo de tirosina conservada. Os STATs são então liberados do receptor e se dimerizam com o outro (GONZALES et al., 2014). Esses dímeros são translocados para o núcleo onde se ligam a sequências específicas de DNA e induzem a transcrição do gene alvo. Portanto, enzimas JAK desempenham um papel fundamental para iniciar respostas biológicas dentro da célula, permitindo que proteínas extracelulares como citocinas transmitam sinais para o núcleo das células-alvo (GONZALES et al., 2014).

Em particular, citocinas pró-inflamatórias que usam a via JAK, tais como interferon- γ e interleucinas (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-21 e IL-23, têm sido implicados na doença inflamatória (O'SHEA et al., 2004). Além disso, citocinas derivadas de Th2, incluindo IL-31 e linfopoetina do estroma tímico (TSLP), são ligantes para nervos sensoriais em murinos e humanos e tem uma função crítica para evocar ao prurido (CEVIKBAS et al., 2014). Por estas citocinas também interagirem com JAK, vários inibidores JAK tem recebido muita atenção recentemente como um agente terapêutico para as principais doenças de pele inflamatórias e pruriginosas (FUKUYAMA et al., 2015).

As citocinas JAK1 dependentes desempenham um papel importante em muitos aspectos da alergia (GONZALES et al., 2014). Citocinas são proteínas sinalizadoras secretadas que desempenham um papel fundamental na comunicação célula a célula (GONZALES, 2012). Estes mensageiros podem afetar inúmeros comportamentos celulares como crescimento, desenvolvimento, diferenciação e ativação em uma variedade de células do sistema imunológico, bem como outros tipos de células. Devido ao seu papel na regulação de muitas funções celulares importantes, sua desregulação pode orquestrar uma variedade de mudanças a nível celular e molecular que induzem a indesejados sinais clínicos e as condições de doença crônica (GONZALES et al., 2014).

A desregulação das citocinas tem sido implicada na doença de pele alérgica, particularmente na DA em seres humanos. As citocinas que aparentam ter um aumento na produção são Th2 (por exemplo, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-31), citocinas promotoras de Th2 (TLSP, IL-25, IL-33) e citocinas Th1 (por exemplo, IFN- γ) (GONZALES et al., 2014). Certas citocinas promovem o desenvolvimento de um fenótipo Th2, que agencia a produção de anticorpos IgE e favorece a produção e o recrutamento de células inflamatórias, normalmente associadas à hipersensibilidade, tais como eosinófilos (incremento de imunidade humoral e respostas de hipersensibilidade) (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Demonstrado o envolvimento dessas citocinas na patogênese da DA humana, desencadearam-se investigações sobre seu papel na DA canina. Trabalhos de vários grupos demonstraram que este desequilíbrio de RNAm de citocinas pode existir em cães atópicos. Especificamente, níveis mais elevados de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 mRNA foram vistas na pele integra e lesionada de cães atópicos, comparado com pele de cães saudáveis de controle. Além disso, transcrições de IFN- γ e TNF- α foram elevadas na pele de muitos cães atópicos, sugerindo que um perfil de citocinas Th1-Th2 misto pode ser encontrado, semelhante ao que é visto na DA humana (GONZALES et al., 2014).

Em um modelo experimental de dermatite alérgica canina, feito com cães Beagles com alta produção de IgE sensibilizados contra poeira e ácaros domésticos através do “*patch test*”, observou-se aumento da transcrição das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-13 e IL-18, sustentando a ideia que a desregulação de

citocinas provavelmente desempenha um papel na doença alérgica da pele (GONZALES et al., 2014).

Numerosas outras citocinas podem estar presentes em inflamação atópica ou não atópica. Estas incluem IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IL-8 e IL-18. Estas citocinas são frequentemente multifuncionais e podem mediar uma resposta não específica ou uma inflamação. Portanto, não é totalmente surpreendente que valores de expressão para estas citocinas são, muitas vezes, variáveis ou diretamente contraditórias (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

2.3 Citocinas

IL-1 é uma citocina geral pró-inflamatória que ativa a resposta proteica da fase aguda e aumenta o recrutamento de células inflamatórias (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Tem um papel central na resposta imune inata. Media a fase aguda da inflamação induzindo resposta local e sistêmica, como a sensibilidade a dor, febre, vasodilatação e hipotensão. Também promove a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, que permite a infiltração de células inflamatórias e imunocompetentes dentro dos tecidos (ABRAMOVITS et al., 2013).

Na epiderme, é produzida por queratinócitos através da estimulação de citocinas inflamatórias, sendo que o extrato córneo é o maior reservatório de IL-1 ativo. A liberação da IL-1 da epiderme após sua ativação é o evento primário que promove as condições inflamatórias da pele através da indução de várias citocinas, mediadores pró-inflamatórios e adesões moleculares (ABRAMOVITS et al., 2013).

IL-4 é uma citocina produzida por células Th2, mastócitos e eosinófilos. Funciona para regular a classe de imunoglobulina de comutação em células B e aumenta a expressão de Fc ϵ RI, o receptor de alta afinidade que vincula o IgE alérgeno-específico em uma variedade de células do sistema imunológico. IL-4 também pode induzir proliferação, sobrevivência e/ou quimiotaxia de muitos tipos de células, como células B, mastócitos e eosinófilos, alguns dos principais mediadores em alergia (GONZALES et al., 2014). IL-4 é comumente considerada a arquetípica citocina Th2. É produzido por algumas células T de mastócitos e possivelmente basófilos. Gene e expressão da proteína de IL-4 tem

sido variavelmente encontrada em cães com AD (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória geral que ativa a resposta proteica da fase aguda e promove o crescimento de linfócitos (PUCHEU-HASTON et al., 2015). É produzida por uma variedade de tipos de células, incluindo os macrófagos e as células T e desempenha um papel fundamental na ativação do sistema de imunidade nata (isto é, a migração de neutrófilos para áreas inflamadas) e promove a diferenciação de células B e a produção de anticorpos (GONZALES et al., 2014).

IL-10 é produzida por células ativadas Th3 e Tr1, linfócitos e mastócitos. Uma de suas atividades é inibir a função de macrófagos, diminuindo tanto a síntese de citocinas como a apresentação antigênica. Diminui, ainda, a proliferação e a função secretora de Th1, facilitando o desenvolvimento da resposta Th2 (FORTE, 2015). Demonstrou-se expressão elevada de IL-10 em pele com lesões de cão atópico. Em contraste, não houve diferença na expressão espontânea de IL-10 circulantes de cães atópicos e saudáveis (PUCHEU-HASTON et al., 2015). IL-10 também tem sido associada com doenças alérgicas. No entanto, esta citocina pode mediar qualquer inflamação tipo Th2 ou atuar como uma citocina reguladora (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

IL-17 é produzida por linfócitos Th17 e tem receptores nas células epiteliais, onde promovem a liberação de quimiocinas para neutrófilos, permitindo a fagocitose de bactérias extracelulares e a defesa contra fungos. Seu aumento é descrito em casos de dermatite atópica em humanos (FORTE, 2015).

Interferon-gama (IFN- γ) é um importante imunomodulador, aumentando a imunidade inata e a adaptativa. É o principal ativador de macrófagos. Inibe a proliferação de Th2 e de Th17, resultando na diminuição de IgE e aumento da IgG total (FORTE, 2015). É considerada a 'canônica' das citocinas Th1, como IL-4 é para respostas imunes de Th2. Níveis de IFN- γ em pele atópica canina lesionada são superiores do que em pele saudável ou não lesionada (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) é sintetizado especialmente por monócitos e macrófagos. Apresenta importante ação antitumoral e outras muito semelhantes a IL-1 (FORTE, 2015). É citocina pró-inflamatória geral que aumenta o recrutamento de células inflamatórias (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Filagrina é uma das proteínas mais importantes presentes no processo de queratinização. Mutações que afetam a porção C-terminal no gene da Filagrina (FLG) são um dos fatores de risco confirmados para o desenvolvimento da DA em pacientes humanos (MARSELA et al., 2013).

Finalmente, a IL-31 é uma citocina recentemente identificada que induz comportamento de prurido quando injetada em animais, além de ter sido encontrada em cães naturalmente com dermatite atópica, sugerindo que a IL-31 pode ser uma importante citocina responsável pela resposta pruridogênica em cães (GONZALES et al., 2014). IL-31 pode ser detectada em mais de 50% das amostras de soro de cães atópicos, mas não em cães com outras doenças inflamatórias de pele ou em cães saudáveis (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

A expressão de IL-31 não só está aumentada em pacientes com dermatite atópica, mas também naqueles com dermatite de contato alérgica. Em ambas as doenças, a expressão de IL-31 foi associada com a expressão das citocinas Th2 IL-4 e IL-13. Além disso, as citocinas conhecidas relacionadas a dermatite atópica são IL-5, IL-13 e TNF- α , com importância emergente para IL-17, que parece na inflamação das vias aéreas após a exposição cutânea aos antígenos.

Já Rabenhorst e Hartmann (2014), relatam que níveis sorológicos e mRNA de IL-31 foram estudados intensivamente em doenças diferentes, especialmente em doenças alérgicas. Enquanto a expressão de IL-31 foi primeiramente associada ao prurido, tornou-se cada vez mais evidente que IL-31 também realiza funções adicionais importantes. Na maioria das doenças investigadas até agora, como mastocitose, DA, dermatite de contato alérgica, linfoma cutâneo primário de células T e rinite alérgica, os níveis de IL-31 significativamente correlacionam com a severidade da doença, mas não necessariamente com prurido.

A administração de IL-31 induziu prurido em Beagles de laboratório (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Quando inicialmente caracterizada em ratos transgênicos, a superexpressão de IL-31 levou ao desenvolvimento de vários sinais de indicação de DA, que incluíam aumento de infiltrado inflamatório celular na pele, prurido grave, lesões de pele e alopecia (GONZALES et al., 2013).

Células Th2 caninas são uma fonte de IL-31 e sugerem que uma linha celular monocítica e células neuronais expressam o receptor IL-31. Em uma doença multifacetada como a dermatite atópica canina, a combinação de polarização Th2 e presença microbiana pode levar a efeitos de IL-31 mediada de condução, através da indução de sinalização em macrófagos e interação neuronal direta, inflamação e prurido (MCCANDLESS, 2012). Esta citocina, por sua vez, pode ativar diretamente os nervos periféricos, expressando o receptor IL-31 para induzir comportamentos pruriginosos e ativar células adicionais, expressando o receptor para conduzir os sinais clínicos associados com a DA (GONZALES et al., 2015).

2.4 Apresentação Clínica da dermatite atópica

Desde as descrições iniciais de DA canina há mais de sete décadas, vários estudos com foco em sinais clínicos e, mais tarde, sua confiabilidade como critérios diagnósticos têm sido publicados e revisados. Prurido, especialmente nas patas, face e axilas, foi descrito em algumas das primeiras publicações enfocando as manifestações cutâneas da DA canina (BIZIKOVA et al., 2015). Na figura 3 observa-se a distribuição das lesões clínicas e prurido mais comumente encontrada em cães com DA e hipersensibilidade alimentar.

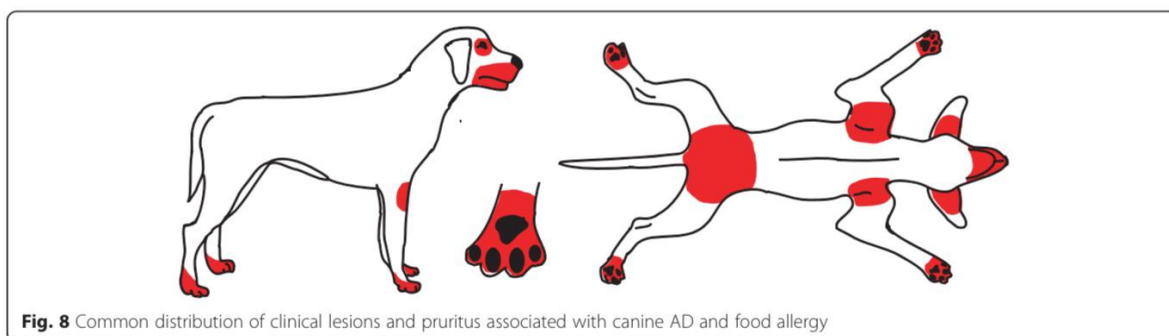


FIGURA 3: localização mais comum das lesões clínicas e prurido associados com DA e alergia alimentar. (OLIVRY et al., 2015).

As características clínicas mais importantes incluem a presença de prurido, associado a lesões de pele com uma distribuição característica ao redor da boca, olhos (especialmente na presença de conjuntivite), orelhas, flexura de articulações do cotovelo, do carpo e Tarso, dígitos e pele interdigital, abdome ventral, períneo e face ventral da cauda proximal (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). E Bizicova et al. (2015) completa dizendo que o prurido parece preceder outros sinais clínicos (isso foi denominado prurido *sine materia* em algumas publicações) e é responsivo a ação de esteroides.

Algumas raças apareceram a exibir fenótipos mais específicos, incluindo o Shar-pei e White West Highland Terrier, com prurido mais frequente e lesões na região dorso lombar ou cães Pastores Alemães, com lesões que afetam os cotovelos, membros traseiros e tórax (BIZIKOVA et al., 2015). As lesões perioculares e perinasais podem refletir a coexistência de uma conjuntivite ou rinite atópica prurítica, respectivamente (OLIVRY et al., 2010). Na figura 4 observam-se as áreas corporais mais acometidas pela DA canina em diferentes raças.

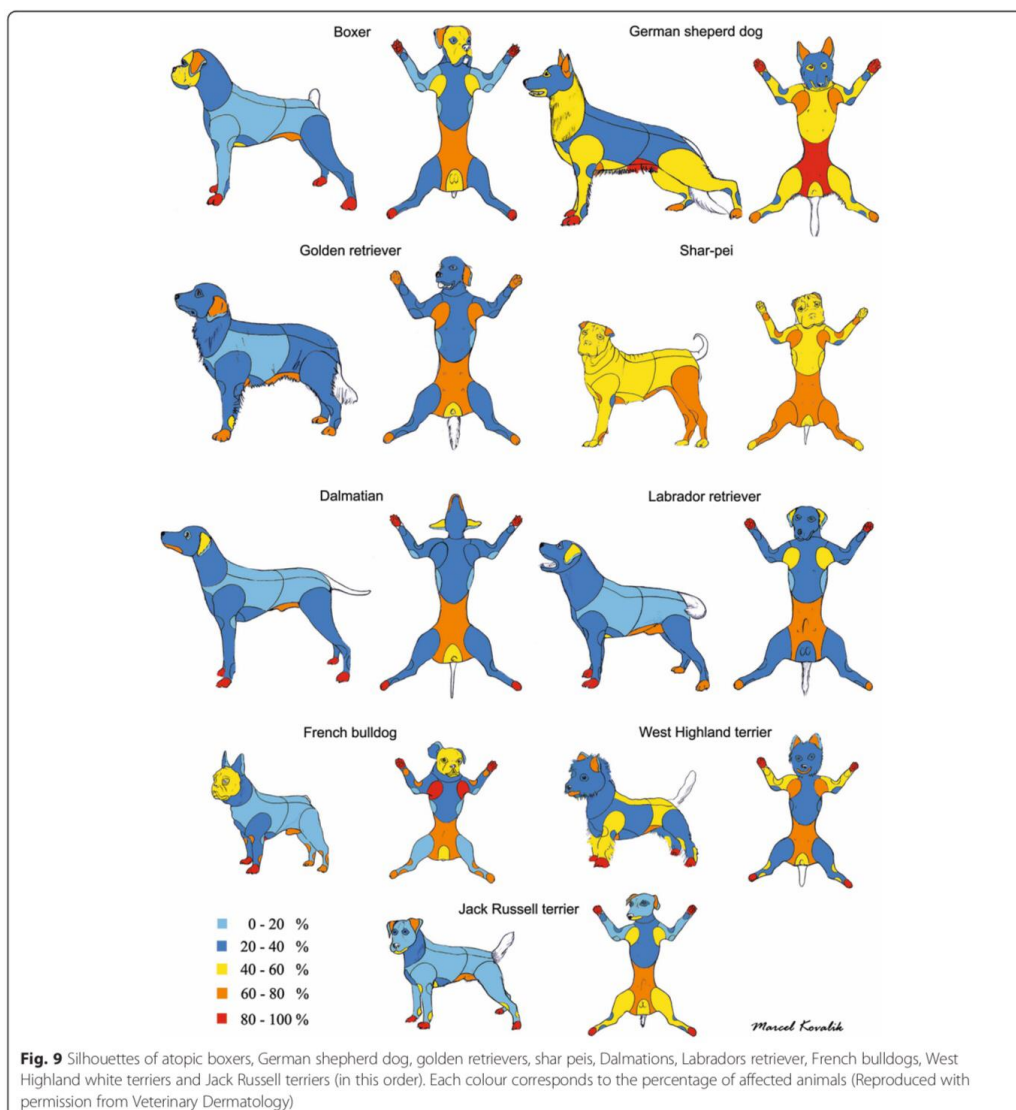


FIGURA 4: áreas corporais mais acometidas pela DA canina em diferentes raças (OLIVRY et al., 2015).

As lesões cutâneas primárias consistem habitualmente em máculas eritematosas, manchas e pápulas. A maioria dos pacientes, contudo, apresenta lesões que são secundárias a um traumatismo auto induzido, tais como escoriações, alopecia auto induzida, liquenificação e hiperpigmentação. A distribuição das lesões cutâneas da DA canina é variável e depende provavelmente do caráter crônico da doença e dos alérgenos envolvidos (OLIVRY et al., 2010). Além disso, leveduras e infecções bacterianas têm sido relatadas como frequentes complicações afetando cães com DA. Algumas características clínicas menos comuns, tais como urticária (2 – 3%), dermatite

úmida aguda (1 – 11%), hiperidrose (4 – 13%), fístulas interdigitais (13 – 22%) e seborreia (8-14%), foram avaliadas nas publicações recentes.

2.5 Diagnóstico da dermatite atópica

O diagnóstico clínico da DA canina pode ser feito sem necessariamente empregar testes intradérmicos ou sorologia de IgE, embora estes possam contribuir para a tomada de decisão clínica em termos de terapia-alvo (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Muitos cães normais e atópicos apresentam reações positivas em ambos os testes, diminuindo, assim, de forma muito pronunciada a especificidade destes testes para o diagnóstico da DA (FUKUYAMA et al., 2017).

No entanto, estes testes podem ser utilizados pelas seguintes razões: 1) para documentar se a doença está associada a uma IgE alérgeno-específica ou não (isto é, para determinar se o cão sofre de DA ou de ALD), 2), para implementar intervenções direcionadas para a evicção dos alérgenos (por exemplo, medidas para eliminação dos ácaros em casa), e/ou 3) para selecionar os alérgenos a incluir nas preparações de imunoterapia (FUKUYAMA et al., 2017).

Olivry *et al.* (2015), afirmam na revisão do consenso sobre dermatite atópica canina, que "testes alérgicos" nunca devem ser usados para diagnosticar DA; devem ser solicitados apenas para definir hipersensibilidade mediada por IgE em cães já diagnosticados com DA por critérios clínicos. Não há atualmente nenhuma padronização no desempenho dos ensaios de soro de IgE alérgeno-específicos para alérgenos ambientais, e há evidências de que os resultados dos testes serológicos de IgE podem variar substancialmente entre laboratórios.

2.5.1 Critérios de Favrot

Uma nova ferramenta para auxiliar a interpretação dos achados clínicos quando confrontados com um cão pruriginoso é a aplicação de critérios clínicos, conhecido como "Critérios de Favrot". São um conjunto de critérios que foram desenvolvidos a partir de uma grande série de casos confirmados de DA canina. A análise revelou dois conjuntos de critérios, que produzem diferentes sensibilidade e especificidade para a condição. Por exemplo, o uso de um

conjunto de critérios que produz a maior especificidade é mais provável garantir que um caso particular na verdade tem DA canina. No entanto, este conjunto excluiria alguns cães pruriginosos que sofram da doença. Um conjunto rendendo a sensibilidade mais alta é mais provável capturar casos de DA canina, mas poderia permitir que alguns cães com outras condições se classifiquem como DA, quando na verdade eles não são (HENSEL et al., 2015).

É crucial lembrar que esses critérios não devem ser usados isoladamente como um "teste diagnóstico" para DA canina. Eles devem ser aplicados juntamente com outros fatores diagnósticos (HENSEL et al., 2015).

Os critérios de Favrot (FAVROT et al., 2010) para a DA canina são:

- 1) Aparecimento dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
- 2) O cão vive dentro de casa, na maior parte do tempo
- 3) O prurido primário responde ao tratamento com glicocorticoides
- 4) O prurido, numa fase inicial, é "sine matéria" (ou seja, um prurido sem lesões)
- 5) Apresenta afecção de membros torácicos
- 6) Tem os pavilhões auriculares afetados
- 7) As margens dos pavilhões auriculares não estão afetadas
- 8) A zona dorso-lombar não está afetada

Um conjunto de cinco critérios tem uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 79% para diferenciar cães com DA de cães com prurido crônico ou recorrente sem DA. A adição de um sexto parâmetro positivo aumenta a especificidade para 89%, mas diminui a sensibilidade para 58% (FAVROT et al., 2010).

2.5.2 Características do exame histopatológico

Todos os estudos são focados na reação de fase tardia da pele (por exemplo, eritema, espessamento), que é acreditada para assemelhar-se lesões vistas em cães com DA. Em geral, a reação de fase tardia da pele foi caracterizada por um padrão inflamatório composto perivascular superficial para dermatite mononuclear intersticial com neutrófilos e eosinófilos. Degranulação de mastócitos e eosinófilos foi relatada ao desafio de alérgeno. Uma hiperplasia epidérmica irregular com exocitose linfocítica e eosinofílica, resultando em uma

formação ocasional de microabcessos eosinofílicos e infiltração da pele lesional com células dendríticas epidérmicas e dérmicas também foram relatados (BIZIKOVA et al., 2015).

2.6 Diagnóstico diferencial

É extremamente importante reconhecer que outras dermatoses podem reproduzir os sintomas ou sobrepor-se à DA. Estas doenças são, habitualmente, provocadas por parasitas (principalmente a escabiose e, ocasionalmente, a demodicose), agentes infecciosos (por exemplo, piodermites superficiais provocadas por *Staphylococcus* sp. ou dermatite por *Malassezia* sp.) ou tem outra origem alérgica, como a dermatite alérgica a picada de ectoparasitas ou a alergia a trofoalérgenos. Estas doenças têm de ser excluídas ou controladas antes de se poder fazer um diagnóstico de DA (OLIVRY et al., 2010).

2.7 Tratamento

Muitos fatores contribuem para a inflamação e prurido na dermatite atópica. A estratégia terapêutica deve focar nestes fatores que podem ser identificados e nas quais medidas intervencionistas podem ser factíveis. Estes incluem ectoparasitas, infecção por bactérias e fungos e hipersensibilidade alimentar (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

Ectoparasitas, particularmente pulgas, não são a causa da dermatite atópica, mas são um fator de confusão pois podem exacerbar o prurido e medidas preventivas são indicadas (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

Infecção bacteriana e por leveduras são frequentemente associadas à DA e terapia tópica e/ou sistêmica deve ser considerada, seguida por um tratamento tópico regular para prevenir recidivas (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Para melhorar a eficácia da terapia antimicrobiana, veterinários são aconselhados a seguir as diretrizes de tratamento antimicrobiano estabelecidas no seu país de prática e/ou nas recomendações do consenso internacional, ditadas pelo ultimo *guideline* de HILLIER et al. (2014).

Dependendo da severidade dos sinais clínicos da dermatite atópica, tratamentos sintomáticos e/ou terapia intervencionista específica para alergia

ambiental (evasão do alérgeno, imunoterapia alérgeno-específica) pode ser implementada (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

Em 2010, a força-tarefa internacional na dermatite atópica canina (ICADA) publicou as primeiras diretrizes para padronizar como consenso o tratamento da DA em cães (OLIVRY et al., 2015).

Segundo o ICADA, o tratamento para as crises agudas deve envolver a busca e eliminação da causa, banhos com xampus suaves e glicocorticoides e/ou oclacitinib. Já para a DA crônica, pode-se somar à terapêutica a ciclosporina, a imunoterapia, a administração de ácidos graxos e aplicações proativas intermitentes de glicocorticoide tópico.

A estratégia terapêutica deve ser revista em intervalos regulares e adaptada para as necessidades individuais do paciente. Normalmente o sucesso a longo prazo vem com a combinação de vários tratamentos que maximizam os benefícios e minimizam os malefícios (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

O tratamento desta doença é claramente multifacetado e as intervenções devem ser combinadas para um benefício ideal comprovado (ou provável). Além disso, o tratamento deve ser adaptado para cada paciente, dependendo do estágio da doença, sua gravidade e a distribuição das lesões. Os veterinários também devem se lembrar de avaliar e discutir com os proprietários do animal de estimação o benefício de cada medida de intervenção, seus efeitos colaterais, sua facilidade de administração e seu custo como um único medicamento ou modalidade combinada. Em última análise, a qualidade de vida de cães e seus proprietários, bem como as preferências deste último, devem ser consideradas antes que um plano de tratamento é projetado (OLIVRY et al., 2015).

2.7.1 Imunoterapia

Os mecanismos pelos qual a ASIT (imunoterapia alérgeno- específica) atua em cães não foram completamente elucidados, embora eles tendem a seguir paralelamente aos conhecimentos em humanos: redução inicial na atividade das células efetoras (eosinófilos, basófilos, mastócitos) seguida de uma mudança imunológica a longo prazo de uma resposta Th2 celular para uma resposta Th1 celular e desenvolvimento da tolerância imunológica (DE BOER, 2017). O valor da ASIT como um tratamento para modificar o comportamento da

DA canina continua a ser suportado por (na maior parte descontrolados) estudos relatando pelo menos uma eficácia moderada (OLIVRY et al., 2015).

2.7.2 Corticoide tópico

Sprays de glicocorticoide tópico são eficazes para o tratamento de lesões cutâneas localizadas de DA canina. Na ausência de disponibilidade destas formulações, outras formulações tópicas com glicocorticoide são teoricamente propensas a serem benéficas, mas a eficácia e segurança destes medicamentos podem variar com a potência do glicocorticoide e veículo utilizado (OLIVRY et al., 2015).

2.7.3 Corticoide sistêmico

Glicocorticoides são frequentemente utilizados para proporcionar alívio do prurido, pois eles são altamente eficazes e têm uma velocidade rápida de ação; no entanto, os efeitos adversos a curto prazo e crônicos são comuns (GADEYNE et al., 2014) em cerca de 30 a 80% dos casos (MOYAERT et al., 2017). Problemas graves, tais como poliúria, polidipsia, polifagia, micção inapropriada nas casas, alterações comportamentais e dispneia, podem ser um problema para o proprietário do animal de estimação, interferir com a qualidade de vida do cão e resultar em diminuição da confiança do proprietário. Administração de glicocorticoides a longo prazo pode resultar em condições graves de saúde, incluindo a pancreatite, ulceração gastrointestinal, lipidemia, diabetes mellitus, perda muscular e hiperadrenocorticismismo iatrogênico (COSGROVE et al., 2013).

Não se recomenda o tratamento de crises agudas de DA canina com glicocorticoides injetáveis de ação prolongada, pois aumenta o risco de eventos adversos (OLIVRY et al., 2015).

2.7.4 Ciclosporina

Ciclosporina é um polipeptídeo cíclico com propriedades imunossupressoras reversíveis que tem como alvo, através de sua inibição da calcineurina, linfócitos-T e outras células envolvidas nas respostas alérgicas e imunológicas. Ciclosporina tem sido usada também para tratamento da dermatite atópica canina e para outras doenças de pele de cães, como fístula perianal e

adenite sebácea. Uma revisão sistemática de ensaios clínicos, registrando-se cães com DA relataram o início relativamente lento do efeito da ciclosporina, com escores de lesão e prurido de pele diminuir por 30 – 52% e 27 – 34% após quatro semanas de tratamento, respectivamente (PANTERI et al., 2016).

Ciclosporina sistêmica e tacrolimus tópico podem efetivamente controlar a dermatite atópica, mas o início retardado de ação torna impraticável como uma terapia independente para o controle rápido do prurido (COSGROVE et al., 2013). Para fornecer um alívio mais rápido dos sinais clínicos da DA, glicocorticoides orais são administrados concomitante a ciclosporina no início do tratamento (PANTERI et al., 2016).

2.7.5 Anti-histamínicos

Anti-histamínicos orais do tipo 1 da primeira geração (i.é., difenidramina, clorfeniramina...) provocam um benefício pequeno e limitado em alguns cães com DA, que talvez ocorra por causa do seu efeito sedativo. Devido ao seu modo de ação e para um maior benefício, ele deve ser preferencialmente administrado antes que a crise ocorra para bloquear os efeitos da histamina. Também parecem ser mais benéficos para cães com DA moderada. Não há evidência de suporte para o uso de formulações anti-histaminas do tipo 1 tópicas para o tratamento de cães com DA (OLIVRY et al., 2015).

2.7.6 Cuidados com pele e pelagem

Tomar banho pelo menos uma vez por semana com um xampu suave não irritante e água morna é susceptível de ser benéfica. A intensidade e a frequência de banhos podem ser o fator mais importante no alívio do prurido. O tipo de xampu deve ser adaptado a cada caso: xampus emolientes são produtos mais suaves, mas xampus antiseborreicos e antissépticos podem ser mais apropriados em cães com pele oleosa, disqueratótica e/ou em caso de infecção. Não obstante, banhos com xampus podem ser ressecantes e irritantes. Se necessário, o veterinário deve considerar mudar protocolos ou produtos e/ou adicionar tópicos hidratantes pós-banho. Também devem estar preparados para mudar o tratamento usado se alterar o estado da pele e do pelame do cão. O

impacto de banhos frequentes na redução da eficácia de produtos tópicos de controle de pulgas também deve ser considerado (OLIVRY et al., 2015).

Grandes esforços têm se dedicado a identificar formas de corrigir a disfunção da barreira para diminuir o risco de sensibilização alérgica em casos iniciais, bem como para diminuir o prurido e inflamação mesmo em casos crônicos onde a sensibilização já ocorreu. Numerosos estudos em humanos demonstraram que a eficácia de emolientes e hidratantes para promover a melhoria de barreira da pele, e a aplicação diária de cremes hidratantes tem constituído por anos o esteio da terapia para pacientes com DA. Produtos normalmente usados contêm uma combinação de ceramidas, ácidos graxos e outros ingredientes naturais, como ácido glicirretínico, que podem diminuir a inflamação e proteases (MARSELLA, 2012).

2.7.6.1 Suplementação com ácidos graxos essenciais

A ingestão oral de ácidos graxos essenciais (AGE), especialmente aqueles ricos em ômega-6, como suplemento ou em dietas enriquecidas pode influenciar lipídios superficiais da pele e melhorar o brilho e a qualidade da pelagem. AGE orais também podem fornecer algum pequeno benefício em reduzir os sinais clínicos da DA em cães, mas o grau limitado de melhora esperada torna improvável que a suplementação de AGE seria adequada para monoterapia de AD canina.

Ácidos graxos essenciais podem melhorar a barreira cutânea e ajudar a melhorar a dermatite atópica, mas geralmente não são o primeiro tratamento de escolha para controlar o prurido agudo (COSGROVE et al., 2013).

2.7.6.2 Aplicação de formulações tópicas contendo ácidos graxos essenciais

Formulações lipídicas tópicas podem ajudar a normalizar os defeitos existentes na barreira lipídica do extrato córneo em cães com DA. Por causa da inconsistência em termos de resultados de ensaios clínicos, existem provas ainda insuficiente sobre o benefício de formulações tópicas contendo lipídios e recomendações como monoterapia para a DA canina. O benefício, custo e facilidade de uso de formulações tópicas contendo AGE como terapia adjuvante

para cães deve ser pesado sobre os suplementos orais de AGE ou dietas enriquecidas. É provável que o benefício de formulações tópicas contendo AGE seja mínimo em cães já suplementados com dietas ricas em AGE (OLIVRY et al., 2015).

Porém, Barbosa, em 2015, relata que a reposição tópica de lipídeos foi capaz de minimizar a expressão tegumentar de IL-31, os valores do CADESI e os scores do prurido (espontâneo e esclarecido), melhorando assim a qualidade de vida do animal.

2.7.7 anticorpos monoclonais

Lokivetmab (ZTS-00103289) é um anticorpo monoclonal “caninizado” que se liga ao IL-31 na circulação, inibindo assim a sua ligação ao receptor IL-31. A neutralização de IL-31 após a administração subcutânea do lokivetmab resultou na redução do prurido canino induzido por IL-31 em cães por até oito semanas após uma única dose (MOYAERT et al., 2017).

Em sua dose de bula, é uma terapia rápida, segura e eficaz para controlar o prurido em cães com dermatite alérgica. É muito bem tolerada em cães saudáveis, bem como em cães com doenças sistêmicas e/ou cutâneas simultâneas (SOUZA et al., 2018).

2.8 Oclacitinib

Como o papel da desregulação das citocinas na doença tornou-se mais evidente, fármacos que inibem a atividade de citocinas entraram na medicina e medicina veterinária (COSGROVE et al., 2015). Inibidores de JAK estão sendo desenvolvidos por diversas empresas farmacêuticas para o tratamento de uma variedade de alterações inflamatórias, auto-imunes e hematológicas em seres humanos (GADEYNE et al., 2014).

A primeira geração de inibidores JAK inclui tofacitinib, ruxolitinib, baricitinib e oclacitinib. Oclacitinib não tem nenhuma indicação aprovada pela FDA em humanos e é usado para tratamento da DA em cães (DAMSKY e KING, 2016).

Um inibidor JAK está atualmente em fase clínica de estudos III em humanos para tratamento de doenças de pele alérgica, demonstrando uma

ótima eficácia (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/mostrar/NCT02001181>). Oclacitinib foi o primeiro inibidor seletivo de JAK licenciado para uma indicação semelhante em cães que sofrem pelo prurido atópico (FUKUYAMA et al., 2017). Inibidores JAK, tais como oclacitinib, foram aprovados para uso crônico em cães com DA, mas há ainda muito a se aprender sobre os efeitos a longo prazo ao inibir essas vias (COSGROVE et al., 2015).

Fukuyama et al., em 2015, demonstraram que a tofacitinib e oclacitinib apresentam efeitos anti-inflamatórios e antipruriginosos duplos em DA canina por aplicação tópica. Estes resultados podem representar uma nova opção de tratamento para doenças de pele alérgica, tais como hipersensibilidade de contato e dermatite atópica. Aplicação tópica de tofacitinib e oclacitinib minimiza efeitos colaterais vistos pela exposição sistêmica, tais como aumentos na creatinina sérica, aumento do risco de herpes zoster e leucopenia, bem como permite níveis mais elevados de inibição de citocina no tecido local, que podem proporcionar rápido e forte alívio da coceira e inflamação alérgica. Foi o primeiro grupo que se tem notícia a realizar este tipo de estudo.

Apoquel® (maleato de oclacitinib) foi o primeiro inibidor seletivo de JAK a ser desenvolvido para cães, aprovado para o controle do prurido associado com dermatite alérgica e controle da dermatite atópica em cães de pelo menos 12 meses de idade (MARSELLA, 2012).

Os mecanismos moleculares envolvidos em estimular a resposta de prurido têm sido elaborados e agora entende-se que citocinas desempenham um papel chave em iniciar a estimulação neuronal da coceira que desencadeia o comportamento pruriginoso (arranhar, esfregar, mastigar, etc.) em cães. Isto conduz ao estabelecimento de um ciclo vicioso de coceira que exacerba as lesões de pele e amplifica os defeitos na função de barreira da pele em cães clinicamente afetados (MARSELLA et al., 2012).

Oclacitinib tem sido relatado como sendo rapidamente eficaz na redução de lesões de pele e prurido em cães com dermatites alérgicas e com DA. A velocidade de alívio do prurido com oclacitinib é paralela a da prednisolona, com melhora visível em manifestações de coceira observadas dentro do primeiro dia da administração de ambas os fármacos (PANTERI et al., 2016).

Quando testada junto a ciclosporina em uma experimentação controlada randomizada, oclacitinib mostrou uma redução mais rápida de prurido, com um efeito similar em melhorar as lesões de pele ao longo do tempo (PANTERI et al., 2016).

2.8.1 Mecanismo de ação

Oclacitinib é uma nova terapia-alvo que age nas principais vias envolvidas no prurido e inflamação associados a alergia ao inibir seletivamente citocinas dependentes de JAK1, com efeitos mínimos contra citocinas dependentes de JAK2 envolvidas na hematopoiese (COSGROVE et al., 2013).

Muitas citocinas hematopoiéticas ligam-se a receptores de homodiméricos que não recrutam JAK1, mas em vez disso, recrutam pares de JAK2/JAK2 para a transdução de sinal e indução da proliferação de células da medula óssea.

Embora o oclacitinib parecesse ser potente contra JAK2 em ensaios enzimáticos isolados, sua ação em citocinas que envolvem receptores complexos utilizando pares de JAK2/JAK2 não foi significativa em ensaios celulares (GONZALES et al, 2014).

Citocinas, incluindo interleucinas, interferons (IFNs) e outras moléculas, utilizam o sinal transdutor da JAK e ativador da transcrição (JAK-STAT) como via para transmitir sinais da membrana celular para o núcleo. Com a junção de ligantes extracelulares, proteínas intracelulares de JAK, que se associam com receptores de citocinas do tipo I/II, tornam-se ativados e fosforilam as proteínas STAT, que dimerizam e translocam então para o núcleo diretamente regular a expressão gênica (DAMSKY e KING, 2016).

Efeitos do oclacitinib na função das citocinas envolvidas na inflamação (IL-2 e IL-6), alergia (IL-4 e IL-13), prurido (IL-31) como também na hematopoese (eritropoetina e GM-CSF), e resposta celular imune nata (IL-12 e IL-23) foram especialmente avaliadas. Oclacitinib foi capaz de inibir IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31 com IC₅₀'s variando entre 36 a 249 nM, e foi muito menos potente contra eritropoetina e GM-CSF, com IC₅₀'s por volta de 1000 nM em ambas citocinas. Oclacitinib não apresentou uma inibição significativa na função da IL-12 e da IL-23. A figura 5 representa esta dinâmica (GONZALES et al, 2014).

IL-12 e IL-23 ligam-se a receptores que recrutam JAK2 e TYK2, reconfirmando mínima ou nenhuma atividade em complexos de receptores de citocinas que não são dependentes da enzima JAK1. Estas citocinas são produzidas por células apresentadoras de antígenos em resposta a patógenos microbianos, tais como vírus, bactérias e parasitas e desempenham um papel chave em engajar-se no sistema imune adaptativo. Sua atividade é essencial na prevenção de infecções graves e em induzir respostas adequadas para combater invasores estranhos ao organismo (COSGROVE et al., 2013).

IL-31 canina foi escolhida como o agente pruridogênico devido à sua capacidade demonstrada para induzir prurido em cães, e à sua presença em cães com doenças de pele alérgica, incluindo DA. Administração de cIL-31 produziu uma potente e aguda resposta pruriginosa em cães Beagles normais em 20 – 40 min após a infusão, permitindo que o prurido pudesse ser avaliado sob uma janela de observação tão curta quanto duas horas.

Em resumo, o modelo de prurido de IL-31 foi capaz de detectar a eficácia de terapias antipruriginosas, como glicocorticoides e oclacitinib, e dosar as diferenças nas respostas entre elas. Além disso, pode-se através dele avaliar novas formulações e utiliza-lo como referência nas terapias usuais da prática clínica (GONZALES et al., 2015).

No entanto, o mecanismo exato do oclacitinib na resposta ao prurido em doenças de pele alérgicas permanece obscuro (FUKUYAMA et al., 2017). Expandir nosso painel de testes para outras citocinas JAK-dependentes envolvidas em atividades celulares de resposta imune inata semelhantes, tais como interferons (IFN $\alpha/\beta/\gamma$) do tipo I e tipo II IFN- γ , será importante para compreender melhor os efeitos do oclacitinib nas citocinas envolvidas em respostas imunidade celular nata (GONZALES et al, 2014).

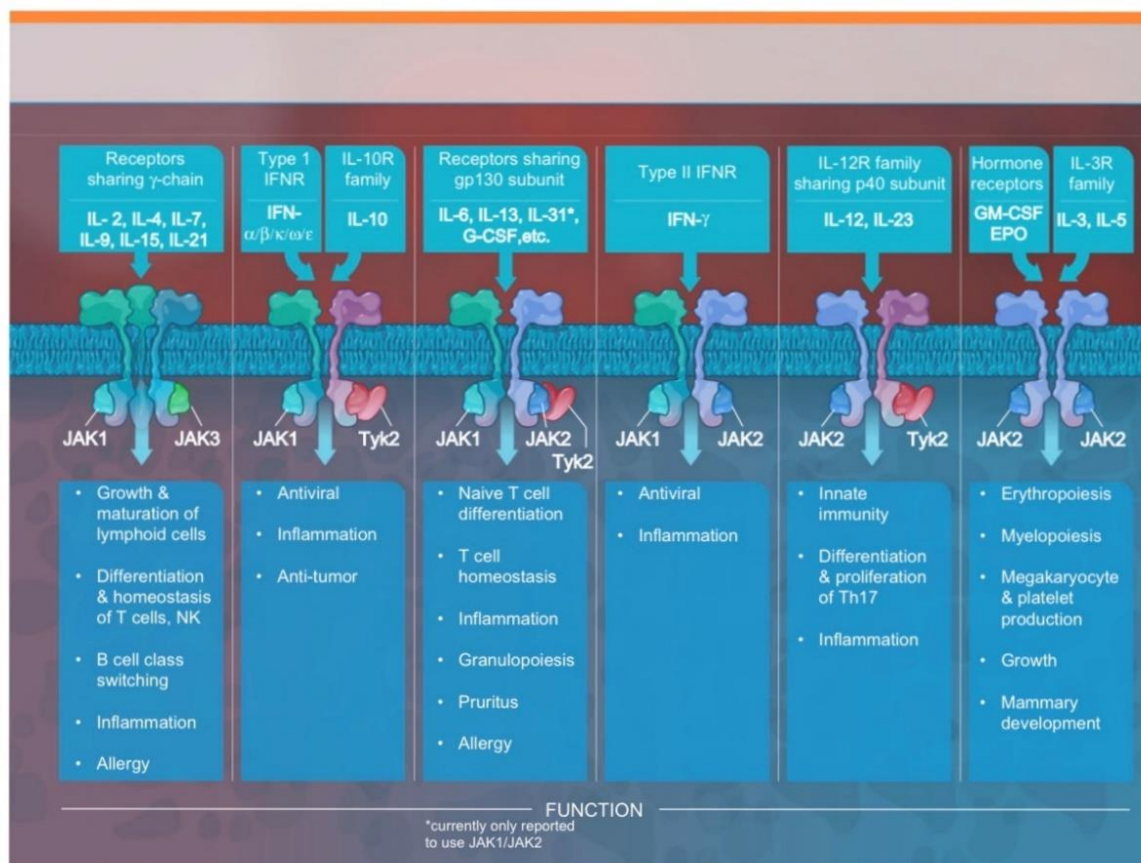


FIGURA 5: famílias de citocinas que utilizam enzimas Janus quinase (JAK) para sinalização. As citocinas são pequenas proteínas secretadas por células que podem produzir uma variedade de respostas, como crescimento, desenvolvimento, diferenciação e ativação de células imunes, bem como tipo de células não imunes. Citocinas exercem esses efeitos biológicos ligando-se a receptores na superfície das células. Vários receptores de citocinas dependem da associação e ativação de enzimas JAK na porção citoplasmática do receptor, afim de transmitir sinais ao núcleo e produzir mudanças necessárias dentro da célula. Receptores de citocinas podem ser agrupados de acordo com os tipos de JAKs que são recrutados para os complexos receptores. Muitas citocinas envolvidas na alergia, inflamação e prurido ligam complexos receptores que utilizam JAK1. Por exemplo, IL-2 e IL-4 se ligarão aos complexos receptores que recrutam JAK1 e JAK3. IL-6 e IL-13 ligam-se a receptores que envolvem JAK1, JAK2 e TYK2. E a IL-31 irá ativar receptores que ativam JAK1 e JAK2. Em contraste, várias citocinas envolvidas na hematopoese (GM-CSF, eritropoietina) ou células de defesa da imunidade inata (IL-12 e IL-23) ativam receptores dependentes dos pares JAK2/JAK2 ou JAK2/TYK2 (GONZALES et al, 2014).

2.8.2 Efeitos colaterais

A administração a longo prazo de oclacitinib está associada com o desenvolvimento de infecção no trato urinário, êmese, diarreia, otite e piodermite em aproximadamente 5 a 10% dos casos. Efeitos adversos severos aparentam serem raros. Alterações em parâmetros laboratoriais (hematológicos, painel bioquímico e urinálise) parecem ser mínimos após a administração prolongada de oclacitinib em cães atópicos (OLIVRY et al., 2015).

Já Simpson et al. (2017), afirmam que bacteriúria não é um efeito adverso esperado em cães tratados com oclacitinib sem uma história prévia de ITU (infecção do trato urinário) ou condição predisponente durante este período de tratamento, diferentemente de glicocorticoides e ciclosporina, que aumentam a frequência de ITU em cães com doença de pele inflamatória. Portanto, cultura de urina de rotina não é indicada para tais cães na ausência de exame de urina anormal ou sinais clínicos de doença do trato urinário.

Em um estudo feito por Gadeyne et. al, em 2014, comparando a eficácia do oclacitinib e da prednisona em cães atópicos, observou-se que o efeito colateral mais comum em ambos os tratamentos foi a piodermite, avaliada como leve pelos médicos veterinários responsáveis. Esses animais foram tratados com antibióticos sistêmicos ou xampus medicamentosos. A incidência de piodermite em ambos os grupos de tratamento não é surpreendente, dado que cachorros alérgicos são propensos a infecções de pele secundárias; visto que ambos os grupos, prednisolona e oclacitinib, podem aumentar a susceptibilidade a infecções, um efeito possível do fármaco não pode ser completamente excluído em qualquer grupo de tratamento.

Uma grande variedade de medicações concomitantes, incluindo vacinas, antiparasitários, agentes antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios não-esteroides, glicocorticoides e preparações tópicas e dermatológicas, foi bem tolerada pelos cães em um estudo com 26 clínicos veterinários nos EUA feito por Cosgrove, et al. em 2015. Esta busca corrobora os resultados de estudos clínicos anteriores em que estes resultados clínicos também são compatíveis com os dados de inibição enzimática do citocromo P450 canino *in vitro* pelo oclacitinib.

As concentrações inibitórias (valores de IC₅₀) são 50 vezes maiores do que as concentrações de plasma terapêutico, indicando que uma interação droga-droga devido à inibição de enzimas de citocromo P450 pelo oclacitinib é improvável. Os resultados deste estudo apoiam a eficácia e a segurança de uso crônico de oclacitinib até 630 dias e sugere uma melhor qualidade de vida para o cão e seu cuidador (COSGROVE et al., 2015).

Como receia-se uma imunossupressão induzida por drogas de potencial dose-dependente, o uso concomitante de glicocorticoides orais com oclacitinib é

provavelmente contraindicada, especialmente no caso de infecções, embora tal uso combinado não tenha sido avaliado (OLIVRY et al., 2015).

DCs ativados podem atuar como uma fonte possível para estas citocinas pruridogênicas (IL-31, TSLP e TNFa), afetando os neurônios sensoriais. A retirada abrupta de oclacitinib pode induzir migração (ou proliferação) de DCs nos gânglios para interagir com os neurônios sensoriais, possivelmente aumentando a sensibilização periférica em dermatite de contato alérgica crônica. Há um fenômeno de rebote significativo na coceira após retirada abrupta do oclacitinib. A dinâmica deste fenômeno de rebote é rápido (24h) e prolongado quando desafiado (4D) e o papel significativo de TRPV1 na coceira necessita de mais investigação (FUKUYAMA et al., 2017).

2.8.3 Resposta clínica

A eficácia do oclacitinib para o controle da DA canina é pelo menos tão boa quanto a de ciclosporina oral e tem um início de efeito clínico significativamente mais rápido (LITTLE et al., 2015). Oclacitinib parece ser uma alternativa adequada para prednisolona para a terapia de combinação durante a indução do tratamento com ciclosporina em cães com DA (PANTERI et al., 2016).

Em estudo feito por Gadeyne et al., em 2014, há evidência que oclacitinib administrado por via oral no regime de dosagem recomendado reduz o prurido e sinais clínicos associados com dermatite alérgica a um nível comparável a eficácia da prednisolona administrada na dose de 0,5 m a 1,0 mg/kg diariamente durante 6 dias seguido da mesma dose todos os dias, comprovando os estudos feitos por Fleck, em 2012, que apontaram que o inibidor de JAK Oclacitinib produziu uma maior supressão do prurido e teve um início de ação mais rápido do que a prednisolona em modelos caninos do prurido.

Em 2013, Cosgrove et al. avaliaram a segurança e a eficácia de oclacitinib em comparação com um placebo para o controle do prurido associado com dermatite alérgica em cães. Baseados na análise binária de sucesso de tratamento, a maioria dos cães tratados com oclacitinib (66,5%) apresentou melhora clínica em comparação com apenas 29,4% dos cães com tratamento placebo, com os proprietários e veterinários observando uma diminuição

substancial no score de VAS prurido e dermatite. Oclacitinib, portanto, parece melhorar o prurido e dermatite substancialmente, proporcionando a pele danificada, uma oportunidade para se curar, permitindo tempo para que o veterinário corretamente faça o diagnóstico e trate a causa subjacente.

A redução rápida e eficaz do prurido também pode melhorar a qualidade de vida para os cães afetados e seus proprietários. Diminuição imediata da ação de citocinas pruridogênicas, incluindo IL-31, em parte pode explicar a rápida diminuição do desconforto após o tratamento com oclacitinib. A melhora nas pontuações da severidade clínica provavelmente é uma consequência do controle do prurido nos cães, mas também pode ser reflexo de uma ação anti-inflamatória direta na pele. Estes decíduos são consistentes com as propriedades farmacológicas de oclacitinib, que é uma terapia-alvo que inibe as principais vias envolvidas na fisiopatologia da inflamação da pele (COSGROVE et al., 2013).

Oclacitinib proporciona um alívio da coceira dentro de vinte e quatro horas que persiste durante o período de tratamento, com mais de 70% dos cães tratados, alcançando uma redução de mais de 50% no prurido no dia 7. Olivry et al (2015) completa dizendo que Oclacitinib oral (Apoquel, Zoetis) deve ser oferecido em 0,4 a 0,6 mg/kg duas vezes ao dia durante 14 dias e uma dose ao dia posteriormente. Obtendo-se a remissão completa dos sinais, ajusta-se a menor dose passível para continuar estabilizando o quadro.

3 OBJETIVOS

Objetivos gerais: avaliar a utilização do oclacitinib comercial na resposta inflamatória de cães atópicos.

Objetivos específicos:

- 1) Relacionar o uso do oclacitinib comercial com respostas Th1, por meio de imuno-histoquímica (anticorpos anti-INF-gama e anti-IL-6 policlonal).
- 2) Relacionar o uso do oclacitinib comercial com respostas Th2, por meio de imuno-histoquímica (anticorpos anti-IL-31 policlonal, anti-IL-10 policlonal e anti-IL-4 policlonal).
- 3) Relacionar o uso do oclacitinib comercial com respostas Th17, por meio de imuno-histoquímica (anticorpos anti-IL-17).
- 4) Relacionar o uso do oclacitinib comercial com respostas a citocinas gerais pró-inflamatórias (anti-IL-1 policlonal e TNF-alfa policlonal,).
- 5) Relacionar o uso do oclacitinib comercial com a restauração da barreira cutânea, por meio de imuno-histoquímica (anticorpo anti-filagrina).
- 6) Avaliar a eficácia e a resposta clínica do oclacitinib comercial em cães com dermatite atópica

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem e local

Todos os procedimentos realizados nos animais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ Unesp Botucatu (nº 200/2016) e os tutores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostragem foi constituída por 10 espécimes caninos, sem quaisquer restrições relativas à definição racial e sexo, com mais de um ano de idade, com diagnóstico estabelecido de dermatite atópica, no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP-Botucatu) e no consultório veterinário Vetderme, localizado em Sorocaba-SP.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão no estudo

Foram incluídos no estudo apenas os cães com diagnóstico pré-estabelecido de dermatite atópica *strictu sensu*.

Foram tomadas precauções para o tratamento com o oclacitinib, segundo informações descritas na bula do Apoquel®. Cães recebendo Apoquel® foram monitorados para o desenvolvimento de infecções, demodicose e neoplasias. Todos estes critérios foram respeitados durante o estudo.

Não foram incluídos ou, durante o protocolo, foram excluídos aqueles animais:

- De proprietários não inteirados do quadro clínico, do temperamento, da conduta e/ou manejo higiênico-sanitário do paciente;
- Que não foram submetidos adequadamente ao protocolo experimental ou ao seguimento clínico.

4.3. Diagnóstico da dermatite atópica

Para inclusão no protocolo experimental, o diagnóstico de dermatite atópica foi estabelecido através do quadro sintomato-lesional apresentado segundo os Critérios de Favrot (2010) explicitados no Quadro 1. Excluíram-se,

por exames complementares como citologia e exame parasitológico de raspado cutâneo, outras dermatopatias primárias pruriginosas miméticas (como a escabiose) e infecções levedúricas e bacterianas secundárias ao quadro alérgico (OLIVRY et al, 2010). As dermatites alérgicas a picadas de ectoparasitas foram descartadas após dois meses de rigoroso controle contra pulgas e carrapatos com a utilização de ectoparasiticidas orais empregados no esquema terapêutico e profilático padrão do serviço de dermatologia (Simparic®, NexGard® ou Bravecto®). As dermatites trofoalérgicas foram excluídas através do teste de eliminação-provocação alimentar, que consiste em submeter o animal a uma dieta restrita com ração hipoalergênica, com proteína hidrolisada (Hypoallergenic Canine®, Royal Canin), por 60 dias (GASCHEN & MERCHANT, 2011).

Todos os cães foram submetidos à pormenorizada anamnese visando obter informações sobre manejo, tempo de evolução das lesões, realização pretérita de exames complementares, emprego de terapia (s) prévia (s) e dos resultados dela obtidos. Após a realização da anamnese, o animal foi submetido a detalhado exame físico, com ênfase no exame dermatológico, e aos exames complementares que se fizeram necessários.

Após a consecução do diagnóstico (dia zero), os proprietários foram cientificados sobre os objetivos do estudo e solicitou-se a concordância firmada para a inclusão no protocolo. Detalhou-se, previamente, aos proprietários, os aspectos básicos sobre dermatite atópica e a alternativa de tratamento com o oclacitinib, bem como eventuais efeitos colaterais (piodermites, otite, vômito e diarreia), tempo provável de tratamento e da importância do comparecimento no retorno aprazado (dia trinta).

QUADRO 1: Critérios de Favrot 2010 para Dermatite Atópica Canina

1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2. Cães habitam normalmente ambientes internos
3. Prurido responsivo a corticosteroides
4. Prurido como sinal inicial (prurido sem lesão)
5. Pavilhões auriculares afetados
6. Patas dianteiras afetadas
7. Margem de orelhas não afetadas
8. Área dorso-lombar não afetada
A combinação de cinco critérios satisfatórios tem uma sensibilidade de 85% e especificidade de 79% para diferenciar cães com DA de cães com prurido crônico recorrente sem DA. A adição de um sexto parâmetro aumenta a especificidade para 89% mas diminui a sensibilidade para 58%.
Fonte: Olivry et al. (2010).

4.4 Metodologia

O protocolo preconizado foi o emprego de oclacitinib comercial, na dose de 0,4 a 0,6 miligramas/quilogramas de peso, via oral, a cada 12 horas nos 14 primeiros dias e a cada 24 horas nos 16 dias subsequentes. O oclacitinib foi fornecido gratuitamente aos proprietários, na embalagem de origem, em quantidade suficiente para a realização do tratamento até o retorno apressado.

Recomendou-se banhos a cada 7 dias, utilizando-se de água morna ou fria, e xampu a base de clorexidine 3%, para evitar infecções bacterianas e fúngicas durante o curso do tratamento.

Na vigência do protocolo, todos os animais foram submetidos a rigoroso controle de pulgas e carrapatos, com a prescrição de ectoparasiticidas orais empregados no esquema terapêutico e profilático padrão do serviço de dermatologia (Simparic®, NexGard® ou Bravecto®).

Na primeira consulta e no retorno seguinte, após 30 dias do início do tratamento com Oclacitinib, realizaram-se:

a) A classificação e a quantificação das lesões cutâneas com auxílio de escore CADESI-04 ou “Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index” (OLIVRY et al., 2014), escala que consiste na avaliação de três diferentes tipos lesionais, quantificados com escala de gravidade, variando entre 0 e 3, em 20 distintas regiões corpóreas.

b) a determinação da presença e/ou intensidade do quadro pruriginoso, através da inquirição dos proprietários ou prepostos, considerando a escala numérica verbal e os níveis qualitativos modificados, segundo o escore de prurido de RYBNIČEK et al. (2008). Os tutores foram orientados a atribuírem uma nota de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e posteriormente para que mostrassem em que grau da escala de escore de prurido de RYBNIČEK et al. (2008) em que o animal se encaixava (prurido esclarecido), onde na escala apresentava apenas as classificações, não as numerações.

c) a colheita dos fragmentos de pele da região cervical dorsal, sendo um total de duas colheitas, utilizando *punch* de 6mm, o qual foi colocado sobre a pele, com aplicação de pressão moderada enquanto foi retorcido. Ao penetrar a espessura completa da pele, o *punch* é removido, deixando a amostra de pele ligada à gordura subcutânea, onde foi retirada com o auxílio de uma pinça. O protocolo padrão seguido para as colheitas foi anestesia local com lidocaína 1% sem vasoconstritor, injetada no tecido subcutâneo (HNILICA & PATTERSON, 2018). As amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas em criotubos contendo meio de preservação Tissue Tek® e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido.

4.5 Processamento das amostras de pele e imuno-histoquímica

Após a colheita de todo o material, os fragmentos de pele foram submetidos ao procedimento histopatológico pela técnica de corte de congelação em criostato modelo Leica CM1850, obtendo cortes de 4µm dispostos em lâminas carregadas positivamente (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha), com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento imuno-histoquímico.

Foram realizados 180 cortes, o que resultou em uma lâmina para cada citocina a ser testada em cada um dos animais, nos dois tempos de investigação (dia 0 e dia 30 de tratamento). Após finalizadas, as lâminas foram estocadas no freezer, em temperatura de -20 graus centígrados, e transferidas para cubas de vidro em temperatura ambiente a fim de realizar-se a técnica de imuno-histoquímica. A técnica seguiu o protocolo do laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP - Botucatu, de acordo com a padronização que foi feita para cada anticorpo utilizado. A tabela 3 mostra as diluições e informações técnicas dos anticorpos utilizados.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomatio, Carpinteria, CA, EUA) e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em álcool metílico. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com o reagente comercial Protein block (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

4.6 Interpretação dos resultados

O material finalizado foi examinado de forma independente em microscópio óptico no aumento de 40X por dois patologistas. A quantificação da coloração de imuno-histoquímica foi realizada pelo método semi-quantitativo de escore de distribuição de células marcadas. Em todo o material foram contadas todas as células do corte e realizada uma proporção entre a quantidade de células positivas e células totais. O sistema de escore seguiu o descrito por Fonseca-Alves et al. (2013), sendo que cada amostra recebeu uma nota de 0 a 4, onde 0 significa ausência de marcação nas células, 1: 1-25% de células

positivas, 2: 26-50% de células positivas, 3: 51 a 75% de células positivas e 4: 76 a 100% de células positivas.

TABELA 1: Anticorpos utilizados para a técnica de imuno-histoquímica e suas respectivas especificações e diluições.

Anticorpo primário	Especificações	Diluição
Filagrina	Rabbit polyclonal to Filaggrin (Bioss - Cód. Bs-6327-R)	1:25
IL-31	Anti-IL 31, ac poli de coelho fr 400µl (ABCAM - Cód. ab102750)	1:100
IL-4	Anti-IL4, ac poli de coelho fr 100µl (ABCAM - Cód. AB9622)	1:600
IL-6	Anti-IL6, ac poli de coelho fr 100µl (Cloude clone – Cód. PAA079Ca01)	1:300
IL-10	Anti-IL10, ac poli de coelho fr 100µl (Cloude clone - Cód. PAA056Ca01)	1:400
IL-17	Anti-IL17, ac poli de coelho fr 100µl (ABCAM - Cód. AB79056)	1:300
TNF alfa	Anti-TNF alpha, ac poli de coelho fr 200µl (ABCAM - Cód. AB6671)	1:400
IFN gama	Anti-IFN gamma, ac poli de coelho fr 100µl (Cloud Clone - Cód. PAA049Ca01)	1:600
IL-1 alfa	Anti-IL-1 alpha, ac poli de coelho fr 100µl (Cloud Clone - Cód. PAA071Ca01)	1:100

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das variáveis foi avaliada com análises gráficas (qq plot e histograma) e testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Para avaliar diferenças entre as medianas nos dois momentos (0 e 30) foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, 2007).

6 RESULTADOS

Dez animais da espécie canina com mais de um ano de idade, sem quaisquer restrições relativas à definição racial e sexo, foram selecionados a participar deste trabalho. Todos concluíram o estudo. No anexo A há os resultados finais de todas citocinas e filagrina testadas no trabalho.

Das citocinas analisadas relacionadas com resposta pró-inflamatória geral (IL-1e TNF- α), apenas a IL-1 apresentou diferença estatística entre o dia 0 e o dia 30 de tratamento ($p=0,0156$).

As citocinas Th1 (INF- γ e IL-6), Th2 (IL-31, IL-10 e IL-4) e a citocina Th17 (IL-17), assim com a Filagrina, não apresentaram diferenças estatísticas durante este período (tabela 3).

TABELA 2: Mediana (Mínimo – Máximo) das variáveis e valor p da comparação entre os momentos 0 e 30

Variável	Momento 0	Momento 30	Valor p
CADESI-4	64 (15 – 72)	23 (2 – 29)	0,0039
Prurido	7 (3 – 10)	3 (2 – 4)	0,0039
IL-1	2 (1 – 3)	1 (1 – 3)	0,0156
IL-4	1 (0 – 3)	1 (1 – 2)	0,3750
IL-6	1 (1 – 3)	1 (0 – 3)	0,7500
IL-10	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,9999
IL-17	2 (1 – 3)	1 (1 – 2)	0,1250
IL-31	3,5 (3 – 4)	3 (1 – 4)	0,5000
TNF α	1 (0 – 3)	1 (0 – 3)	0,4375
IFN- γ	2 (1 – 3)	1 (1 – 3)	0,0625
FILAG	2 (1 – 4)	1,5 (1 – 3)	0,3750

Porém, a resposta clínica dos animais submetidos ao tratamento com o oclacitinib foi positiva. O escore de prurido apresentou um valor $p=0,0039$ e o CADESI-4 um valor $p=0,0039$. Os gráficos *box plot* explicitados nas figuras 6 e 7 ilustram esta variação, assim como as imagens 8 e 9 (dia 0) e 10 e 11 (dia 30) de um dos animais do projeto.

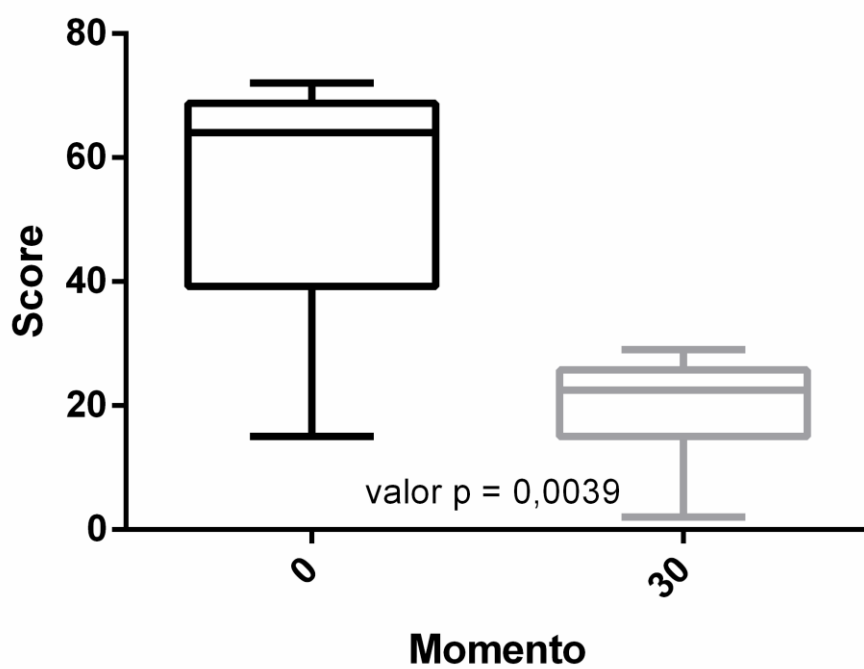


FIGURA 6: Distribuição dos escores de CADESI-4 nos dois momentos avaliados

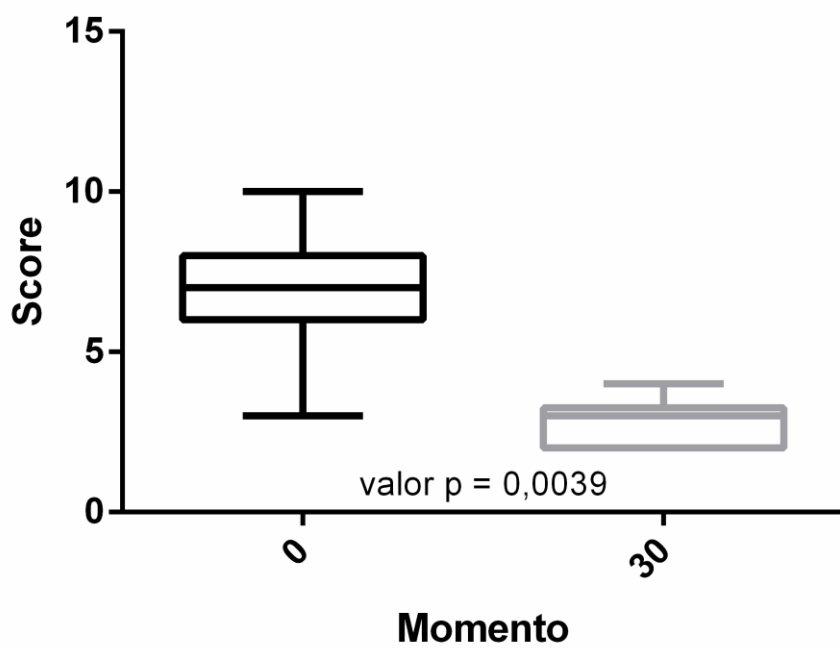


FIGURA 7: Distribuição dos escores de prurido nos dois momentos avaliados



FIGURAS 8 E 9: cão Mel, 2 anos, fêmea, raça Shih-tzu. Dia 0 de tratamento. Intenso eritema em abdômen e membros posteriores, alopecia por arrancamento em região lateral do flanco.



FIGURAS 10 E 11: cão Mel, 2 anos, fêmea, raça shih-tzu. Dia 30 de tratamento. Diminuição do eritema em abdômen e membros posteriores, repilação da região lateral do flanco.

7 DISCUSSÃO

Contradizendo a maioria dos estudos sobre as interleucinas relacionadas a DA, filagrina, e suas alterações frente ao tratamento com oclacitinib, não houve diferenças estatísticas em 30 dias de tratamento, com exceção da IL-1.

Gonzales et al., em 2014, realizou um estudo para avaliar se o oclacitinib poderia reduzir a atividade de algumas citocinas envolvidas em doenças de pele alérgicas, nos cães. Eles utilizaram sistemas isolados de enzimas e modelos celulares caninos e humanos, *in vitro*, para determinar que o oclacitinib tanto inibe a função de citocinas envolvidas na alergia e inflamação, dependentes de JAK-1 (IL-2, IL-4, IL-6 e IL-13), quanto daquela envolvida no prurido (IL-31).

Banovic et al. (2019), através de cultura de células T *in vitro*, demonstrou que só há redução das citocinas INF- γ , IL-10 e TNF- α quando se utiliza uma concentração de oclacitinib 10 vezes maior daquela empregada para DA.

Nota-se que os trabalhos disponíveis até a presente data avaliam em sua maioria as interleucinas de forma sistêmica, por sorologia ou pesquisa de RNAm.

Um dos poucos grupos que utilizou a técnica de imuno-histoquímica para avaliar a expressão inflamatória da pele de cães atópicos foi Mora et. al., em 2007. E Kato et al., em 2014, pesquisou a IL-31 na pele e nervos periféricos de pessoas com DA. Barbosa (2015) relatou que a expressão da IL-31, também mensurada por IHQ, diminuiu com o tratamento de repositor de lipídios comercial. Porém, ao avaliar a filagrina, não se obteve a mesma resposta, semelhante ao observado no presente trabalho.

Há algumas hipóteses que podem ter influenciado na manutenção do score de marcação das interleucinas e Filagrina após 30 dias de tratamento com oclacitinib:

- O tempo de tratamento com oclacitinib pode ter sido insuficiente para promover mudanças no padrão das citocinas;
- O método de IHQ pode não ser o ideal para avaliar essas interleucinas. Seria necessário fazer a análise sérica desses mesmos pacientes e correlacioná-las.
- 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).

8 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.

9 BIBLIOGRAFIA

ABRAMOVITS, W.; BEJARANO, J.J.R.; VALDECANTOS, W.C. Role of interleukin 1 in atopic dermatitis. *Dermatology clinics*, v.31, p. 437-444, 2013.

BARBOSA, L.C. Análise imunohistoquímica 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.

BANOVIC, F.; TARIGO, J.; GORDON, H.; BARBER, J.P.; GOGAL Jr, R.M. Immunomodulatory *in vitro* effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production. *Veterinary Dermatology*, v.30, p.17-e6, 2019.

BEXLEY, J.; NUTTALL, T. J.; HAMMERBERG, B.; FITZGERALD, J. R.; HALLIWELL, R. E. Serum anti-Staphylococcus pseudintermedius IgE and IgG antibodies in dogs with atopic dermatitis and nonatopic dogs. *Veterinary Dermatology*, v.24, p.19-e6, 2013.

BIZIKOVA, P.; PUCHEU-HASTON, C. M.; EISENSCHENK, M. N.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T.; SANTORO, D. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.26, p.95-e26, 2015.

BIZIKOVA, P.; SANTORO, D.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T.; EISENSCHENK, M. N.; PUCHEU-HASTON, C. M. Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.26, p.79–e24, 2015.

COLLARD, W. T.; HUMMEL, B.; FIELDER, A.; KING, V.; BOUCHER, J.; MULLINS, M.; STEGEMANN, M. The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a

Janus kinase inhibitor, in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.37, p.279—285, 2013.

COSGROVE, S. B.; CLEAVER, D. M.; KING, V. L.; GILMER, A. R.; DANIELS, A. E.; WREN, J. A.; STEGEMANN, M. R. 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.

COSGROVE, S. B.; WREN, J. A.; CLEAVER, D. M.; MARTIN, D. D.; WALSH, K. F.; HARFST, J. A.; STEGEMANN, M. R. 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.

DAMSKY, W.; KING, B. A. JAK inhibitors in dermatology: The promise of a new drug class. *J Am Acad Dermatol*, v.76, n.4, p.736-744, 2016.

DAY, M. Introduction: the immunological basis of allergic diseases. In: C. NOLI.; A. FOSTER; W. ROSENKRANTZ. *Veterinary Allergy*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2014. p. XV-XXI.

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.

DEBOER, D. J. The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology*, v.28, p. 25-e6, 2017.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, v.21, p.23-31, 2010.

FLECK, T.; HUMPHREY, W.; COSCARELLI, E.; GALVAN, B.; ALEO, M.; GONZALES, A.; SHELLY, J.; MAHABIR, S.; MCCALL, R. Comparison of the

janus kinase (JAK) inhibitor, oclacitinib, and prednisolone in canine models of pruritus. *Veterinary Dermatology*, v.23, p.38, 2012.

FORTE, W.C.N. *Imunologia do básico ao aplicado*. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 339p.

FUKUYAMA, T.; EHLING, S.; COOK, E.; BÄUMER, W. 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.

FUKUYAMA, T.; GANCHINGCO, J. R.; BÄUMER, W. Demonstration of rebound phenomenon following abrupt withdrawal of the JAK1 inhibitor oclacitinib. *European Journal of Pharmacology*, v.792, pp. 20-26, 2017.

GADEYNE, C.; LITTLE, P.; EDWARDS, N.; DAVIS, K.; STEDEMANN, M. R. 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.; BOWMAN, J. W.; FICI, G. J.; ZHANG, M.; MANN, D. W.; MITTON-FRY, M. 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.; FLECK, T. J.; HUMPHREY, W. R.; GALVAN, B. A.; ALEO, M. M.; MAHABIR, S. P.; TENA, J.; GREENWOOD, K.G.; MCCALL, R. B. 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.

GONZALES, A. J.; HUMPHREY, W. R.; MESSAMORE, J. E.; FLECK, T. J.; FICI, G. J.; SHELLY, J. A.; BAMMERT, 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, p.48-e12, 2013.

GraphPad Software, Inc. 2007. Prism (Data analysis software system), version 5.0 Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, v.11:196, p.1-13, 2015.

HILLIER, A.; LLOYD, D.H.; WEESE, S.; BLONDEAU, J.M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, E.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M.G.; RANKIN, S.; TURNIDGE, J.D.; SYKES, J.E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, v.25, p. 163–e43, 2014.

HSU, S.M.; RAINE, L.; Fanger, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.29, p.577-580, 1981.

KATO, A.; FUJII, E., WATANABE, T.; TAKASHIMA, Y.; MATSUSHITA, H.; FURUHASHI, T.; MORITA, A. Distribution of IL-31 and its receptor expressing cells in skin of atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, v.74, p.229–235, 2014.

LITTLE, P. R.; KING, V. L.; DAVIS, K. R.; COSGROVE, S. B.; STEGEMANN, M. R. 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.

MARSELLA, R. Fixing the skin barrier – Past, present, and future: Humans and dogs compared. *Veterinary Dermatology*, v.24, p.73-e18, 2013.

MARSELLA, R. The aberrant immune system in atopic dermatitis. In: CHIARA, N.; FOSTER, A.; ROSENKRANTZ, W. *Veterinary Allergy*. 1 ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2014. p. 16-23.

MARSELLA, R.; SANTORO, D.; AHRENS, K.; THOMAS, A. L. Investigation of the effect of probiotic exposure on filaggrin expression in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.24, p.260–e57, 2013.

MCCANDLESS, E. E.; MESSAMORE, J.; RUGG, C.; FICI, G.J.; GONZALES, A.J. Production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of inflammatory and neuronal target cells, *Veterinary Dermatology*, v.23, p.52, 2012.

MORA, F.; FUENTE, C.; JASMIN, P.; GATTO, H.; MARCO, A.; FERRER, L.; FONDATI, A.; FONDEVILA, D.; TORRES, R. Evaluation of the expression. Of P-selectin, ICAM-1, and TNF-alpha in bacteria-free lesional skin of atopic dogs with low-to-mild inflammation. *Veterinary Immunology and immunopathology*, v.115, p.223-229, 2007.

MOYAERT, H.; BRUSSE, L.; BOROWSK, S.; ESCALADA, M.; MAHABIR, S.; WALTERS, R. STEGEMANN, M. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.28, p.593–e145, 2017.

NOBBE, S.; DZIUNYCZ, P.; MÜHLEISEN, B.; BILSBOROUGH, J.; DILLON, S. R.; FRENCH, L. E.; HOFBAUER, G. F. IL-31 Expression by Inflammatory Cells is Preferentially Elevated in Atopic Dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 92, p.24-28, 2012.

NUTTALL, T. The genomics revolution: Will canine atopic dermatitis be predictable and preventable? *Advances in Veterinary Dermatology*, v.7, p.10-18, 2013.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; BENSIGNOR, E.; PRÉLAUD, P. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Veterinary Dermatology*, v.18, p. 390-391, 2007.

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, p. 233-248, 2010.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. A.; MULLER, R. S.; NUTTALL, T.; PRÉLAUD, P. 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.; DEBOER, D.J.; BENSIGNOR, E.; PRÉLAUD, P. The International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Veterinary Dermatology*, v.18, p.390–391, 2007.

OLIVRY, T.; MAYHEW, D.; PAPS, J. S.; LINDER, K. E.; PEREDO, C.; RAJPAL, D.; COTE-SIERRA, J. 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.

OLIVRY, T.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTTALL, T.; BENSIGNOR, E.; GRIFFIN, C.G.; HILL, P.B. 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. *Veterinary Dermatology*, v.25, p.77-e25, 2014.

ORANGE, A.; WOLLENBERG, A.; DELEURAN, M.; SIMON, D.; SZALAI, Z.; KUNZ, B.; KOBYLETZKI, L. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 positi on paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatr ic patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v.30, p.729-747, 2016.

O'SHEA, J.J., PESU, M., BORIE, D.C., CHANGELIAN, P.S. A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat Rev Drug Discov*. v.7, p.555-64, 2004.

PANTERI, A.; STREHLAU, G.; HELBIG, R.; PROST, C.; DOUCETTE, K. Repeated oral dose tolerance in dogs treated concomitantly with ciclosporin and oclacitinib for three weeks. *Veterinary Dermatology*, v.27, p.22-e7, 2016.

PUCHEU-HASTON, C. M.; BIZIKOVA, P.; EISENSCHENK, M. N.; SANTORO, D.; NUTTALL, T.; MARSELLA, R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.26, p.115–e30, 2015.

PUCHEU-HASTON, C. M.; BIZIKOVA, P.; MARSELLA, R.; SANTORO, D.; NUTTALL, T.; EISENSCHENK, M. N. 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.

PUCHEU-HASTON, C. M.; SANTORO, D.; EISENSCHENK, M. N.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T. Review: Innate immunity, lipid metabolism and nutrition in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.26, p.104-e28, 2015.

RABENHORST, A.; HARTMANN, K. Interleukin-31: A Novel Diagnostic Marker of Allergic Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*, v. 14:423, p.2-7, 2014.

ROSKOSKI JR.; R. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacological Research*, v. 111, p.784–803, 2016.

RYBNÍČEK, J.; LAU-GILLARD, P.; HARVEY, R.; HILL, P. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology*, v.20, p.115-122, 2008.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; PUCHEU-HASTON, C. M.; EISENSCHENK, M. N.; NUTTAL, T.; BIZIKOVA, P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host–micro-organism interaction. *Veterinary Dermatology*, v.26, p.84-e25, 2015.

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

SIMPSON, A. C.; SCHISSLER, J. R.; ROSYCHUK, R. A.; MOORE, A. The frequency of urinary tract infection and subclinical bacteriuria in dogs with allergic dermatitis treated with oclacitinib: a prospective study. *Veterinary Dermatology*, v.28, p.1-10, 2017.

SOUZA, C. P.; ROSYCHUK, R. A.; CONTRERAS, E. T.; SCHISSLER, J. R.; SIMPSON, A. C. A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. *Veterinary Dermatology*, v.30, 1-9, 2018.

WEESE, J. S. (2012). The skin microbiome in health and disease. *ESVD and ACVD, Veterinary Dermatology*, v.23, p.15, 2012.

WHEELER, D.W.; CIVIL, J.; PAYNEJOHNSON, M.; STEGEMANN, M.R.; COSGROVE, S.B. Oclacitinib for the treatment of pruritus and lesions associated with canine flea-allergic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.23, p.38-39, 2012.

9 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Rural. As normas de formatação podem ser consultadas no site:

<http://coral.ufsm.br/ccrrevista/normas.htm>

Artigo de investigação segundo as normas da Ciência Rural

Título: Avaliação da resposta inflamatória, por imuno-histoquímica e sorologia, na pele de cães atópicos com a utilização de oclacitinib comercial

Autores: Juliana Caltabellotta Gomes Morad, José Francisco A. Ribeiro, Camila Domingues Faria, Luiz Henrique de Araújo Machado

Avaliação da resposta inflamatória, por imuno-histoquímica, na pele de cães atópicos com a utilização de oclacitinib comercial [Assessment of the inflammatory response by immunohistochemistry in the skin of atopic dogs with the use of commercial oclacitinib].

RESUMO

Dermatite atópica (DA) canina é uma enfermidade alérgoinflamatória 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. 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. Conclui-se que o oclacitinib foi eficaz em levar a melhora do quadro clínico e de prurido e 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 novas drogas que contemplam estas propriedades.

PALAVRAS-CHAVE: Dermatite atópica, Oclacitinib, Resposta inflamatória, Interleucina.

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis (DA) is a chronic inflammatory alergic 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 etiopathology, 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, Oclacitinib, Inflammatory response, Interleucine.

INTRODUÇÃO

Dermatite atópica (DA) é uma doença alérgica de pele comum, crônica, recorrente, inflamatória e pruriginosa, com muitas semelhanças clínicas em seres humanos e cães. A patogênese da DA envolve alteração no sistema imunológico e disfunção de barreira cutânea decorrentes de uma cada vez mais complexa interação de fatores genéticos e ambientais (OLIVRY et al., 2016).

As características clínicas mais importantes incluem a presença de prurido, associado a lesões de pele com uma distribuição característica ao redor da boca, olhos, orelhas, flexura de articulações do cotovelo, do carpo e tarso, dígitos e pele interdigital, abdome ventral, períneo e face ventral da cauda proximal (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Bizicova et al (2015) completa dizendo que o prurido parece preceder outros sinais clínicos.

O diagnóstico definitivo da DA canina pode ser difícil, já que essa doença não tem nenhum sinal clínico patognomônico. Isto é devido a diversidade da apresentação clínica, que pode depender de fatores genéticos (fenótipos associados a raça), extensão das lesões (localizadas contra generalizadas), estágio da doença (aguda versus crônica) e a presença de infecções microbianas secundárias ou outros fatores de crise. Além disso, alguns aspectos da doença podem se assemelhar a outras condições de pele que não estão relacionadas a DA canina (HENSEL et al., 2015).

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).

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). 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). Longos períodos de prurido podem significativamente afetar a qualidade de vida de cães afetados e seus proprietários (GONZALES et al, 2015). Novos conhecimentos sobre a patogênese tem um impacto direto sobre como diagnosticar e tratar a DA canina e são a base de novos tratamentos que chegarão em nossas prateleiras farmacêuticas no futuro (DEBOER, 2014).

Citocinas são proteínas sinalizadoras secretadas que desempenham um papel fundamental na comunicação célula a célula (GONZALES, 2013). Estes mensageiros podem afetar inúmeros comportamentos celulares como crescimento, desenvolvimento, diferenciação e ativação em uma variedade de células do sistema imunológico, bem como outros tipos de células (GONZALES et al., 2014).

Em particular, citocinas pró-inflamatórias que usam a via JAK, tais como interferon- γ e interleucinas (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-21 e IL-23, têm sido implicados na doença inflamatória (O'SHEA et al., 2004). Numerosas outras citocinas podem estar presentes em inflamação atópica ou não atópica. Estas incluem IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , IL-8 e IL-18. Estas citocinas são frequentemente multifuncionais e podem mediar uma resposta não específica ou uma inflamação. Portanto, não é totalmente surpreendente que valores de expressão para estas citocinas são, muitas vezes, variáveis ou diretamente contraditórias (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Além disso, citocinas derivadas de Th2, incluindo IL-31 e linfopoetina do estroma tímico (TSLP), são ligantes para nervos sensoriais em murinos e humanos e tem uma função crítica para evocar ao prurido (CEVIKBAS et al., 2014). Por estas citocinas também interagirem com JAK, vários inibidores JAK tem recebido muita atenção recentemente como um agente terapêutico para as principais doenças de pele inflamatórias e pruriginosas (FUKUYAMA et al., 2015).

O inibidor de janus quinase (JAK), oclacitinib, é uma terapia-alvo que inibe seletivamente caminhos chaves que levam a estimulação do prurido e a inflamação cutânea, particularmente através da inibição da JAK-1 que sinaliza a interleucina-31, citocina que induz prurido em cães (LITTLE et al., 2015).

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a utilização do oclacitinib comercial na resposta inflamatória de cães atópicos. Os objetivos específicos relacionam o uso do oclacitinib comercial com resposta Th1, Th2, Th17, resposta a citocinas gerais pró-inflamatórias e com a restauração da barreira cutânea (anticorpo anti-filagrina), por meio de imuno-histoquímica. Também se avaliou a eficácia e a resposta clínica do oclacitinib comercial em cães com dermatite atópica, através da análise do CADESI-4 e escore de prurido.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Amostragem e local

Todos os procedimentos realizados nos animais do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ Unesp Botucatu (nº 200/2016) e os tutores assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostragem foi constituída por 10 espécimes caninos, sem quaisquer restrições relativas à definição racial e sexo, com mais de um ano de idade, com diagnóstico estabelecido de dermatite atópica, no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP-Botucatu) e no consultório veterinário Vetderme, localizado em Sorocaba-SP.

2 Critérios de inclusão e exclusão no estudo

Foram incluídos no estudo apenas os cães com diagnóstico pré-estabelecido de dermatite atópica *strictu sensu*.

Foram tomadas precauções para o tratamento com o oclacitinib, segundo informações descritas na bula do Apoquel®. Cães recebendo Apoquel® foram monitorados para o desenvolvimento de infecções, demodicose e neoplasias. Todos estes critérios foram respeitados durante o estudo.

Não foram incluídos ou, durante o protocolo, foram excluídos aqueles animais:

- De proprietários não inteirados do quadro clínico, do temperamento, da conduta e/ou manejo higiênico-sanitário do paciente;
- Que não foram submetidos adequadamente ao protocolo experimental ou ao seguimento clínico.

3 Diagnóstico da dermatite da dermatite atópica

Para inclusão no protocolo experimental, o diagnóstico de dermatite atópica foi estabelecido através do quadro sintomato-lesional apresentado segundo os Critérios de Favrot (2010). Excluíram-se, por exames complementares como citologia e exame parasitológico de raspado cutâneo, outras dermatopatias primárias pruriginosas miméticas (como a escabiose) e infecções levedúricas e bacterianas secundárias ao quadro alérgico (OLIVRY et al, 2010). As

dermatites alérgicas a picadas de ectoparasitas foram descartadas após dois meses de rigoroso controle contra pulgas e carrapatos com a utilização de ectoparasiticidas orais empregados no esquema terapêutico e profilático padrão do serviço de dermatologia (Simparic®, NexGard® ou Bravecto®). As dermatites trofoalérgicas foram excluídas através do teste de eliminação-provocação alimentar, que consiste em submeter o animal a uma dieta restrita com ração hipoalergênica, com proteína hidrolisada (Hypoallergenic Canine®, Royal Canin), por 60 dias (GASCHEN & MERCHANT, 2011).

Todos os cães foram submetidos à pormenorizada anamnese visando obter informações sobre manejo, tempo de evolução das lesões, realização pretérita de exames complementares, emprego de terapia (s) prévia (s) e dos resultados dela obtidos. Após a realização da anamnese, o animal foi submetido a detalhado exame físico, com ênfase no exame dermatológico, e aos exames complementares que se fizeram necessários.

Após a consecução do diagnóstico (Dia zero), os proprietários foram cientificados sobre os objetivos do estudo e solicitou-se a concordância firmada para a inclusão no protocolo. Detalhou-se, previamente, aos proprietários, os aspectos básicos sobre dermatite atópica e a alternativa de tratamento com o oclacitinib, bem como eventuais efeitos colaterais (piodermite, otite, vômito e diarreia), tempo provável de tratamento e da importância do comparecimento no retorno aprazado (Dia trinta).

4 Metodologia

O protocolo preconizado foi o emprego de oclacitinib comercial (Apoquel®), na dose de 0,4 a 0,6 miligramas/quilogramas de peso, via oral, a cada 12 horas nos 14 primeiros dias e a cada 24 horas nos 16 dias subsequentes.

Recomendou-se banhos a cada 7 dias, utilizando-se de água morna ou fria, e xampu a base de clorexidine 3%, para evitar infecções bacterianas e fúngicas durante o curso do tratamento.

Na vigência do protocolo, todos os animais foram submetidos a rigoroso controle de pulgas e carrapatos, com a utilização de ectoparasiticidas orais empregados no esquema terapêutico e profilático padrão do serviço de dermatologia.

Na primeira consulta e no retorno seguinte, após 30 dias do início do tratamento com Oclacitinib, realizaram-se:

a) A classificação e a quantificação das lesões cutâneas com auxílio de escore CADESI-04 ou “Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index” (OLIVRY et al., 2014), escala que consiste na avaliação de três diferentes tipos lesionais, quantificados com escala de gravidade, variando entre 0 e 3, em 20 distintas regiões corpóreas.

b) a determinação da presença e/ou intensidade do quadro pruriginoso, através da inquirição dos proprietários ou prepostos, considerando a escala numérica verbal e os níveis qualitativos modificados, segundo o escore de prurido de RYBNIČEK et al. (2008). Os tutores foram orientados a atribuírem uma nota de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e posteriormente para que mostrassem em que grau da escala de escore de prurido de RYBNIČEK et al. (2008) em que o animal se encaixava (prurido esclarecido), onde na escala apresentava apenas as classificações, não as numerações.

c) a colheita dos fragmentos de pele da região cervical dorsal, sendo um total de duas colheitas, utilizando *punch* de 6mm, o qual foi colocado sobre a pele, com aplicação de pressão moderada enquanto foi retorcido. Ao penetrar a espessura completa da pele, o *punch* é removido, deixando a amostra de pele ligada à gordura subcutânea, onde foi retirada com o auxílio de uma pinça. O protocolo padrão seguido para as colheitas foi anestesia local com

lidocaína 1% sem vasoconstritor, injetada no tecido subcutâneo (HNILICA & PATTERSON, 2018). As amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas em criotubos contendo meio de preservação Tissue Tek® e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido.

5 Processamento das amostras de pele e imuno-histoquímica

Após a colheita de todo o material, os fragmentos de pele foram submetidos ao procedimento histopatológico pela técnica de corte de congelação em criostato modelo Leica CM1850, obtendo cortes de 4µm dispostos em lâminas carregadas positivamente (StarFrost, Knittel, Braunschweig, Alemanha), com o objetivo de promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro, evitando assim a perda do material durante o processamento imuno-histoquímico.

Foram realizados 180 cortes, o que resultou em uma lâmina para cada citocina a ser testada em cada um dos animais, nos dois tempos de investigação (dia 0 e dia 30 de tratamento). Após finalizadas, as lâminas foram estocadas no freezer, em temperatura de -20 graus centígrados, e transferidas para cubas de vidro em temperatura ambiente a fim de realizar-se a técnica de imuno-histoquímica. A técnica seguiu o protocolo do laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP - Botucatu, de acordo com a padronização que foi feita para cada anticorpo utilizado. A tabela 1 mostra as diluições e informações técnicas dos anticorpos utilizados.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomatio, Carpinteria, CA, EUA) e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em álcool metílico. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com o reagente comercial Protein block (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

TABELA 1: Anticorpos utilizados para a técnica de imuno-histoquímica e suas respectivas especificações e diluições.

Anticorpo primário	Especificações	Diluição
Filagrina	Rabbit polyclonal to Filaggrin (Bioss - Cód. Bs-6327-R)	1:25
IL-31	Anti-IL 31, ac poli de coelho fr 400µl (ABCAM - Cód. ab102750)	1:100
IL-4	Anti-IL4, ac poli de coelho fr 100µl (ABCAM - Cód. AB9622)	1:600
IL-6	Anti-IL6, ac poli de coelho fr 100µl (Cloude clone – Cód. PAA079Ca01)	1:300
IL-10	Anti-IL10, ac poli de coelho fr 100µl (Cloude clone - Cód. PAA056Ca01)	1:400
IL-17	Anti-IL17, ac poli de coelho fr 100µl (ABCAM - Cód. AB79056)	1:300
TNF alfa	Anti-TNF alpha, ac poli de coelho fr 200µl (ABCAM - Cód. AB6671)	1:400
IFN gama	Anti-IFN gamma, ac poli de coelho fr 100µl (Cloud Clone - Cód. PAA049Ca01)	1:600
IL-1 alfa	Anti-IL-1 alpha, ac poli de coelho fr 100µl (Cloud Clone - Cód. PAA071Ca01)	1:100

6 Interpretação dos resultados

O material finalizado foi examinado de forma independente em microscópio óptico no aumento de 40X por dois patologistas. A quantificação da coloração de imuno-histoquímica foi realizada pelo método semi-quantitativo de escore de distribuição de células marcadas. Em todo o material foram contadas todas as células do corte e realizada uma proporção entre a quantidade de células positivas e células totais. O sistema de escore seguiu o descrito por Fonseca-Alves et al. (2013), sendo que cada amostra recebeu uma nota de 0 a 4, onde 0 significa

ausência de marcação nas células, 1: 1-25% de células positivas, 2: 26-50% de células positivas, 3: 51 a 75% de células positivas e 4: 76 a 100% de células positivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição das variáveis foi avaliada com análises gráficas (qq plot e histograma) e testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Para avaliar diferenças entre as medianas nos dois momentos (0 e 30) foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, 2007).

Dez animais da espécie canina com mais de um ano de idade, sem quaisquer restrições relativas à definição racial e sexo, foram selecionados a participar deste trabalho. Todos concluíram o estudo. No anexo A há os resultados finais de todas citocinas e Filagrina testadas no trabalho.

Das citocinas analisadas relacionadas com resposta pró-inflamatória geral (IL-1, IL-6 e TNF- α), apenas a IL-1 apresentou diferença estatística entre o dia 0 e o dia 30 de tratamento ($p=0,0156$).

As citocinas Th1 (INF- γ), Th2 (IL-31, IL-10 e IL-4) e a citocina Th17 (IL-17), assim como a Filagrina, não apresentaram diferenças estatísticas durante este período (tabela 2).

TABELA 2: Mediana (Mínimo – Máximo) das variáveis e valor p da comparação entre os momentos 0 e 30

Variável	Momento 0	Momento 30	Valor p
CADESI-4	64 (15 – 72)	23 (2 – 29)	0,0039
Prurido	7 (3 – 10)	3 (2 – 4)	0,0039
IL-1	2 (1 – 3)	1 (1 – 3)	0,0156
IL-4	1 (0 – 3)	1 (1 – 2)	0,3750
IL-6	1 (1 – 3)	1 (0 – 3)	0,7500
IL-10	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0,9999
IL-17	2 (1 – 3)	1 (1 – 2)	0,1250
IL-31	3,5 (3 – 4)	3 (1 – 4)	0,5000
TNF α	1 (0 – 3)	1 (0 – 3)	0,4375
IFN- γ	2 (1 – 3)	1 (1 – 3)	0,0625
FILAGRINA	2 (1 – 4)	1,5 (1 – 3)	0,3750

Porém a resposta clínica dos animais submetidos ao tratamento com o oclacitinib foi positiva. O score de prurido apresentou um valor $p=0,0039$ e o CADESI-4 um valor $p=0,0039$. Os gráficos box plot explicitados nas figuras 1 e 2 ilustram esta variação, assim como as figuras 3 e 4 (dia 0) e 5 e 6 (dia 30) de um dos animais do projeto.

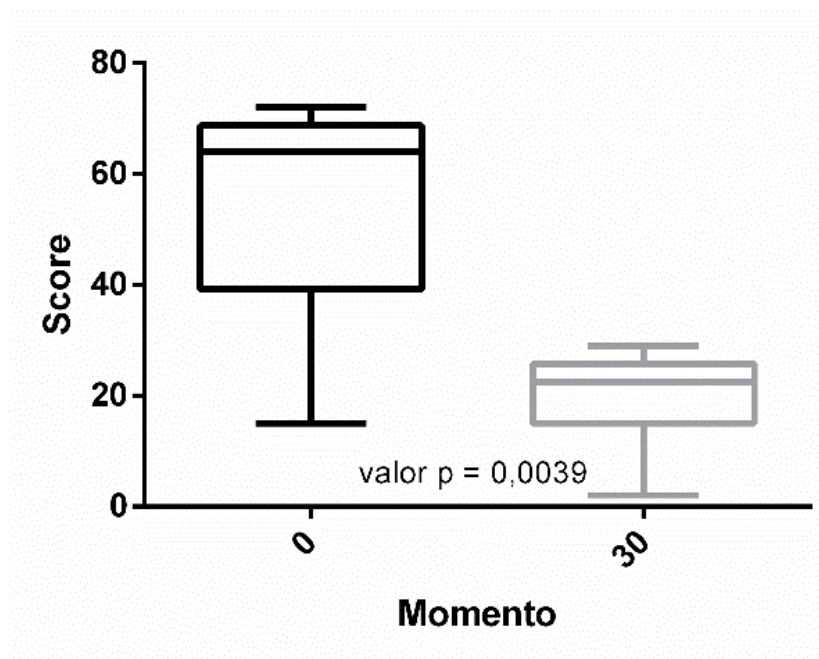


FIGURA 1: Distribuição dos scores de CADESI-4 nos dois momentos avaliados

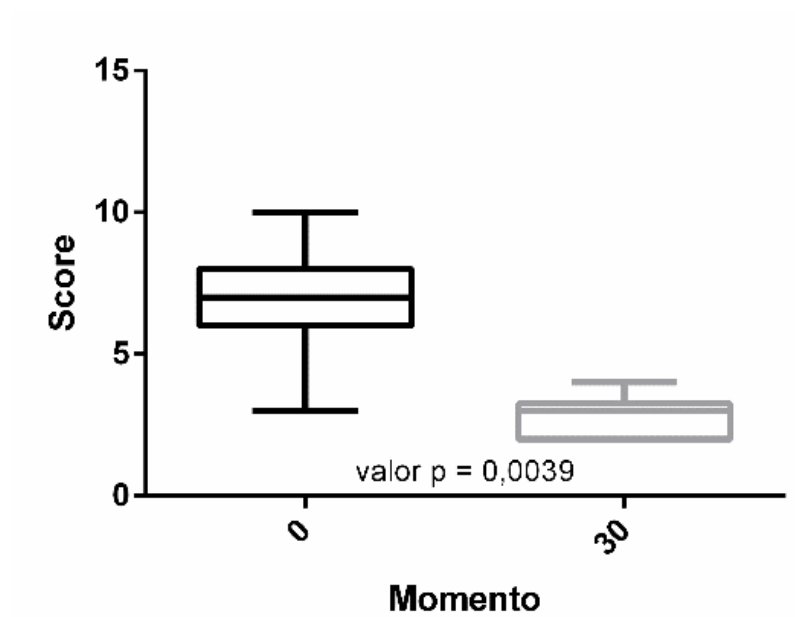


FIGURA 2: Distribuição dos scores de prurido nos dois momentos avaliados



FIGURAS 3 E 4: cão Mel, 2 anos, fêmea, raça Shih-tzu. Dia 0 de tratamento. Intenso eritema em abdômen e membros posteriores, alopecia por arrancamento em região lateral do flanco.



FIGURAS 5 E 6: cão Mel, 2 anos, fêmea, raça Shih-tzu. Dia 30 de tratamento. Grande diminuição do eritema em abdômen e membros posteriores, repilamento da região lateral do flanco.

Contradizendo a maioria dos estudos sobre as interleucinas relacionadas a DA e filagrina, e suas alterações frente ao tratamento com oclacitinib, não houve diferenças estatísticas em 30 dias de tratamento, com exceção da IL-1.

Gonzales et al., em 2014, realizou um estudo para avaliar se o oclacitinib poderia reduzir a atividade de algumas citocinas envolvidas em doenças de pele alérgicas, nos cães. Eles utilizaram sistemas isolados de enzimas e modelos celulares caninos e humanos, *in vitro*, para determinar que o oclacitinib tanto inibe a função de citocinas envolvidas na alergia e inflamação, dependentes de JAK-1 (IL-2, IL-4, IL-6 e IL-13), quanto daquela envolvida no prurido (IL-31).

Banovic et al. (2019), através de cultura de células T *in vitro*, demonstrou que só há redução das citocinas INF- γ , IL-10 e TNF- α quando se utiliza uma concentração de oclacitinib 10 vezes maior daquela empregada para DA.

Nota-se que os trabalhos disponíveis até a presente data avaliam em sua maioria as interleucinas de forma sistêmica, por sorologia ou pesquisa de RNAm.

Um dos poucos grupos que utilizou a técnica de imuno-histoquímica para avaliar a expressão inflamatória da pele de cães atópicos foi Mora et. Al., em 2007. E Kato et al., em 2014, pesquisou a IL-31 na pele e nervos periféricos de pessoas com DA. Barbosa (2015) relatou que a expressão da IL-31, também mensurada por IHQ, diminuiu com o tratamento de repositor de lipídios comercial. Porém, ao avaliar a Filagrina, não se obteve a mesma resposta, semelhante ao observado no presente trabalho.

Há algumas hipóteses que podem ter influenciado na manutenção do score de marcação das interleucinas e Filagrina após 30 dias de tratamento com oclacitinib:

- O tempo de tratamento com oclacitinib pode ter sido insuficiente para promover mudanças no padrão das citocinas;

- O método de IHQ pode não ser o ideal para avaliar essas interleucinas. Seria necessário fazer a análise sérica desses mesmos pacientes e correlacioná-las.

- 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 prodution.** *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 invoved 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.

[illegible]