

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
NOS LIPÍDEOS EPIDÉRMICOS E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
DA DERMATITE ATÓPICA CANINA PELA TÉCNICA DE IMUNO-  
ISTOQUÍMICA

CAMILA DOMINGUES DE OLIVEIRA FARIA

Botucatu - SP  
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
NOS LIPÍDEOS EPIDÉRMICOS E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
DA DERMATITE ATÓPICA CANINA PELA TÉCNICA DE IMUNO-  
ISTOQUÍMICA

CAMILA DOMINGUES DE OLIVEIRA FARIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de doutorado.

Área de concentração: Clínica Médica de Pequenos Animais

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

Faria, Camila Domingues de Oliveira.

Avaliação do uso de células-tronco mesenquimais nos lipídeos epidérmicos e na resposta inflamatória da dermatite atópica canina pela técnica de imunistoquímica / Camila Domingues de Oliveira Faria. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Capes: 50501062

1. Células-tronco. 2. Citocinas. 3. Dermatite atópica. 4. Inflamação. 5. Lipídeos.

Palavras-chave: Células-tronco; Citocinas; Dermatite Atópica; Inflamação; Lipídeos.

Nome do autor: Camila Domingues de Oliveira Faria

Título: AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NOS LIPÍDEOS EPIDÉRMICOS E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA DERMATITE ATÓPICA CANINA PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

### COMISSÃO EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landin  
Membro Titular  
Biotecnologia Animal  
FMVZ-UNESP- Botucatu

---

Prof. Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim  
Membro Titular  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Faria  
Membro Titular  
Departamento de Clínica Veterinária  
PUC - Paraná

---

Prof. Dra. Larissa Botoni  
Membro Titular  
Instituto Qualittas de Pós-Graduação

Data da defesa: 15 de outubro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, que me capacita a alçar voos cada vez mais altos! A Ele todo o louvor por mais esta etapa em minha vida!*

*Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Henrique Araújo de Machado, pela confiança e oportunidade de realizar um sonho, mesmo sabendo das dificuldades de se orientar uma mamãe, já inserida no mercado de trabalho, distante geograficamente da Universidade e que havia quase uma década distante da vida acadêmica. Meu muito obrigada por acreditar que seria possível!*

*Agradeço a meu esposo Douglas Ferreira Faria, companheiro de todas as horas, meu suporte, meu incentivador e apoiador, sem seu apoio nada seria possível. Agradeço a minha filha Maria Luiza Domingues Faria, mesmo tão pequena, compreendeu a ausência e a saudade mãe, espero que no futuro, todo esforço que você viu em sua mãe possa ser um exemplo e te inspirar a seguir seus sonhos! Amo vocês mais do que tudo!*

*Agradeço aos meus pais, José Antônio de Oliveira, Zulmira Domingues de Oliveira, a minha irmã Daniela Domingues de Oliveira, a minha sogra Helena Ferreira Faria e minha cunhada Hadley Ferreira Faria, que fizeram uma rede de apoio, cuidando da minha filha quando precisava me ausentar, não há palavras que possam expressar a gratidão no meu coração, sem vocês a conclusão desta etapa não seria possível.*

*Agradeço as amigas que a dermatologia me deu, Ana Paula Di Martino Frezza e Juliana Morad, a companhia de vocês foi encorajadora!*

*Agradeço a técnica Valéria Morales Dalanezi do Departamento de Patologia Veterinária, que sempre solicitamente, se propôs a me ajudar e foi responsável pela coloração dos lipídeos epidérmicos deste trabalho!*

*Agradeço ao técnico de Laboratório Claudinei Jurandir Figueira, do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina, pelo pronto auxílio nos cortes dos tecidos congelados.*

*Agradeço ao pós-doutorando Carlos Eduardo Alves da Fonseca, por toda paciência, ensino, dedicação e auxílio na realização das imunoistoquímicas, este trabalho também é seu, não há palavras para expressar a gratidão por todo apoio no decorrer deste trabalho!*

*Agradeço a residente do Departamento de Patologia Veterinária, Thainá Oliveira da Silva, pela disponibilidade e auxílio na captação das imagens da técnica de imunoistoquímica!*

*Agradeço minhas amigas e sócias Leila Taranti e Natália Rodas pelo encorajamento, palavras de incentivo e por compreenderem minha ausência em muitos momentos em virtude da confecção desta tese! Muito obrigado por nossa amizade e parceria!*

*"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".*

*"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".*

# LISTAS

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico de dermatite atópica canina.....	37
Quadro 2 - Escore de avaliação de lesões cutâneas (CADESI-4) em cães com diagnóstico de dermatite atópica.....	45
Quadro 3 - Anticorpos primários utilizados para a técnica de imunistoquímica e suas respectivas especificações e diluições.....	47
Quadro 4 - Caracterização dos animais com dermatite atópica excluídos do estudo.....	50
Quadro 5 - Caracterização dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo.....	51
Quadro 6 - Exames laboratoriais no início do estudo (Dia 0) e ao término do tratamento com células-tronco mesenquimais (Dia 90) dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo.....	52

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 – Mediana (Mínimo – Máximo) da escore visual de prurido esclarecido (EVPE) do escore de lesões tegumentares (CADESI-4) dos cães com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.....55
- Tabela 2 - Porcentagem de redução do escore visual de prurido esclarecido (EVPE) e das lesões tegumentares (CADESI-4) dos animais com dermatite atópica ao final do tratamento placebo (Dia 45) e ao final do tratamento com células-tronco mesenquimais (Dia 90).....57
- Tabela 3 - Análise da distribuição dos escores de expressão das citocinas, da proteína filagrina e dos lipídeos epidérmicos entre os: Dia 0, Dia 45, Dia 90 pelo método de Fisher.....59
- Tabela 4 - Correlação de Spearman entre o grau de infiltrado inflamatório e escores de citocinas e filagrina em seus respectivos cortes.....60

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Mecanismo proposto de ação parácrina das células-tronco segundo Leibacher & Henschler (2016) adaptado: .....	28
Figura 2 - Mecanismo proposto de ação das células-tronco segundo Aggarwal & Pittenger (2005).....	29
Figura 3 - Diagrama reportando os efeitos das células-tronco mesenquimais nos diferentes subtipos de linfócitos (Th1, Th2, Th17, Treg) e doenças clínicas importantes associadas com estes fenótipos. Duffy et al., (2011).....	31
Figura 4 - Delineamento Experimental.....	39
Figura 5 - Escala Visual de Prurido Esclarecido (EVPE).....	43
Figura 6 - Escala visual de prurido esclarecido (EVPE) individual dos animais com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.....	54
Figura 7 - Escore individual de lesões tegumentares (CADESI-4) dos animais com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.....	54
FIGURA 8 - Medianas dos escores da escala visual de prurido esclarecido (EVPE) das lesões tegumentares (CADESI-4), dos animais com dermatite atópica, ao longo de todos os momentos de observação do estudo.....	56
FIGURA 9 - Manifestações clínicas do animal com dermatite atópica número dois no momento do diagnóstico e ao término do estudo.....	58
FIGURA 10 - Manifestações clínicas do animal com dermatite atópica número três no momento do diagnóstico e ao término do estudo.....	58

- FIGURA 11 -Corte histológico cutâneo evidenciando marcação com filagrina pela técnica de imunohistoquímica. Escore 4 (Objetiva 10x).....125
- FIGURA 12 -Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL4 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).....125
- FIGURA 13 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL6 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).....126
- FIGURA 14 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL10 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).....126
- FIGURA 15 -Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL31. Escore 2 (Objetiva de 10x).....127
- FIGURA 16 -Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL31. Escore 2 (Objetiva de 40x).....127
- FIGURA 17 -Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudam Red. Escore 1 (Objetiva de 10x).....128
- FIGURA 18 -Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudam Red. Escore 2 (Objetiva de 10x).....128
- FIGURA 19 - Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudam Red. Escore 3 (Objetiva de 10x).....129

## LISTA DE ABREVIações

ALT: alanina aminotransferase

CADESI-4: Escore de lesões tegumentares

CTM: Células-tronco mesenquimais

DA: Dermatite atópica

DAC: Dermatite atópica canina

DAI: Dermatite atópica intrínseca

DAPE: Dermatite alérgica à picada de ectoparasitas

DMSO: Dimetilsulfóxido

FCER1: Receptor de alta afinidade para imunoglobulina tipo E

ELISA: Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima

EVPE: Escala visual de prurido esclarecido

FHNE: Fator de hidratação natural da epiderme

GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos

GGT: Enzima gama glutamil transpeptidase

GvHD: Doença do enxerto versus hospedeiro

IgE: Imunoglobulinas tipo E

IFN: Interferon-gama

IL: Interleucina

ISCT: Sociedade internacional de terapia celular

JACK: Receptor janus kinase

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

PATE: Perda de água transepidermica

PGE2: Prostaglandina E 2

RAST: Teste radioalergoabsorvente

SCCE: Enzima quimiotripsínica do estrato córneo

SCTE: Enzima trípica do estrato córneo

SCIT: Imunoterapia subcutânea

SLIT: Imunoterapia sublingual

TGF: Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)

TNF: Fator de necrose tumoral alfa

T reg: Linfócitos T Regulatórios

Th: Linfócitos T auxiliar

Th1: Linfócitos auxiliar do tipo 1

Th2: Linfócitos auxiliar do tipo 2

WHWT: West Highland White Terrier

# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

**LISTA DE QUADROS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE ABREVIações**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
1.1. Aspectos gerais da dermatite atópica canina.....	6
1.2. Aspectos epidemiológicos e clínicos da dermatite atópica canina.....	9
1.3. Patogenia da dermatite atópica canina.....	13
1.3.1. O papel da barreira cutânea na dermatite atópica canina.....	13
1.3.2. O papel do sistema imunológico na dermatite atópica canina.....	18
1.4. Diagnóstico da Dermatite Atópica Canina.....	20
1.5. Tratamento da Dermatite Atópica Canina.....	21
1.6. Células-Tronco mesenquimais.....	24
1.6.1. Células-tronco mesenquimais no tratamento da dermatite atópica.....	31
1.7. Justificativa.....	34
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivos Gerais.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Seleção dos animais.....	36
3.2. Delineamento Experimental.....	37
3.3. Aplicação de células-tronco mesenquimais.....	39
3.4. Avaliação Laboratorial.....	42
3.5. Avaliação Dermatológica.....	42
3.5.1. Avaliação do prurido.....	42
3.5.2. Avaliação do escore corporal de lesões tegumentares.....	43
3.6. Colheita dos Fragmentos Cutâneos.....	46
3.7. Técnica de Imunoistoquímica.....	46
3.8. Coloração dos lipídeos epidérmicos.....	48
3.9. Análise Estatística.....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
4.1. Caracterização dos animais do estudo.....	50
4.2. Avaliação da segurança do tratamento das células-tronco mesenquimais.....	49
4.3. Avaliação clínica e dermatológica.....	53
4.4. Avaliação da resposta inflamatória cutânea e dos lipídeos epidérmicos.....	59
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>70</b>
<b>8. ARTIGO CIENTÍFICO I.....</b>	<b>85</b>
<b>9. ARTIGO CIENTÍFICO II.....</b>	<b>102</b>

<b>ANEXO I</b> - Dados do padrão de expressão das citocinas inflamatórias, da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica com seu respectivo grau de infiltrado inflamatório e dados do escore de coloração dos lipídeos epidérmicos pela técnica de Sudam Red no Dia 0, Dia 45 e Dia 90 dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo.....	124
<b>ANEXO II</b> - Fotos da técnica de imunistoquímica.....	125
<b>ANEXO III</b> - Fotos da coloração dos lipídeos epidérmicos.....	128

## RESUMO

Faria, C.D.O. **Avaliação do uso de células-tronco mesenquimais nos lipídeos epidérmicos e na resposta inflamatória da dermatite atópica canina pela técnica de imunistoquímica.** Botucatu, 2019 - 129p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A dermatite atópica canina é uma importante alergopatía de ordem genética, inflamatória, pruriginosa e crônica. Os tratamentos existentes atualmente são sintomáticos, algumas vezes insatisfatórios no controle da doença e passíveis de efeitos colaterais. As células-tronco mesenquimais (CTM), pelas suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, podem ser uma alternativa no tratamento da dermatite atópica. Foi realizado um estudo longitudinal, duplo-cego, com período inicial de tratamento placebo com três aplicações quinzenais de soro fisiológico, com posterior aplicação de CTM heterólogas, derivadas de tecido adiposo, em seis cães com dermatite atópica, totalizando três aplicações quinzenais na dose de  $5 \times 10^6$  células por animal. A escala visual de prurido esclarecido (EVPE), o escore de lesões cutâneas (CADESI-4), a resposta inflamatória cutânea pela análise das citocinas IL4, IL6, IL10, IL31 e TNF-alfa e da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica e a avaliação dos lipídeos epidérmicos pela coloração de Sudam III foram comparadas entre o tratamento placebo e com as CTM. O tratamento com CTM foi benéfico para a melhora das manifestações clínicas nos animais com dermatite atópica, diminuindo de forma significativa o escore CADESI-4 e EVPE, com redução consistente de mais de 50% destes dois parâmetros ao final do tratamento com CTM. A melhora clínica evidente nos animais com DA tratados com terapia celular aliadas à baixa frequência de efeitos colaterais, sinaliza que com CTM possa ser considerada como uma modalidade terapêutica bastante promissora no futuro para o tratamento da dermatite atópica canina. Neste estudo, destarte a melhora das manifestações clínicas, com a metodologia empregada não foi visualizada alterações significativas da inflamação cutânea por meio da avaliação das citocinas e nem alterações significativas na expressão da proteína filagrina e nos lipídeos epidérmicos. Não foi observada correlações entres os parâmetros

estudados ao longo do estudo. Estudos posteriores são necessários para avaliar se resultados obtidos seriam diferentes caso fosse realizado um período maior de acompanhamento, um número maior de animais ou empregado outra metodologia para o estudo dos parâmetros avaliados.

**Palavras chaves:** citocinas, lipídeos, atopia, células-tronco, terapia celular, barreira cutânea, imunomodulação, inflamação

## ABSTRACT

Faria, C.D.O. **Evaluation of the use of mesenchymal stem cell in the epidermic lipids and in the inflammatory response of the atopic canine dermatitis through the immunohistochemistry technic.** Botucatu, 2019 - 129p. Thesis (Doctor degree) – Veterinary and Zootechny College, Botucatu Campus, São Paulo University “Júlio de Mesquita Filho”.

The atopic canine is an inflammatory allergic dermatitis frequent and important. The distinct treatment available is symptomatic, currently unsatisfactory in the control of the disease and susceptible to collateral effects. The mesenchymal Stem Cells (MSC) by their immunomodulators and anti-inflammatory characteristics can be an alternative in the treatment of the atopic dermatitis. A longitudinal study was performed, blind-double, with an initial period of placebo treatment within saline solution, after the application of  $5 \times 10^6$  heterologous CTM, derived from adipose tissue, in six dogs with atopic dermatitis. Each treatment constituted of three applications in by-weekly intervals. The visual analog scale of pruritis, the score of skin lesions (CADESI-4), the skin inflammatory response and filaggrin through the immunohistochemistry technique and the evaluation of the skin lipids by the Sudam III coloration were compared between the placebo treatment and the CTM treatment. The treatment with CTM with the used protocol was beneficial to the improvement of the clinical responses of the animals with atopic dermatitis, decreasing significantly the CADESI-4 and EVDP score, with a significant reduction of more than 50% of these two parameters at the end of the treatment with CTM while compared to the placebo. The clinical improvement was evident in animals with DA treated with cellular therapy allied to the low frequency of the collateral effects, indicates that with CTM can be considered as a therapeutic category very promising in the future for the treatment of the atopic canine dermatitis. In this study, despite of the improvement of the clinical manifestations, with the used methodology is, there weren't any significant changes noticed in the skin inflammation through the evaluation of the cytokines type TH1 and TH2 neither significant changes in the expression of the filaggrin protein as well as in the epidermic lipids. Post-studies are required to evaluate if the results obtained would be different in case of a larger period of analysis, a larger number of animals or using another methodology for the study of the evaluated parameters.

**Key Words:** cytokines, lipids, atopy, stem cells, stem therapy, skin barrier, immunomodulation, inflammation

## INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma importante alergopatia em cães, tanto pela sua prevalência, cerca de 10 a 15% da população canina, quanto pela perda na qualidade de vida dos animais e impacto na vida de seus respectivos tutores (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; GEDEON & MUELLER, 2018).

Trata-se de uma dermatopatia de ordem genética, inflamatória e pruriginosa; com características clínicas bem definidas, frequentemente associada à hipersensibilização a alérgenos ambientais, embora esta nem sempre esteja presente (OLIVRY et al., 2001; DEBOER, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; HENSEL et al., 2015; MARSELLA, DE BENEDETTO, 2017).

A DAC é uma doença comum e crescente e, embora seja foco de numerosas pesquisas, o entendimento de sua fisiopatogenia ainda não é totalmente compreendida. É uma doença complexa e multifatorial, na qual interações entre diversos fatores: genéticos, cutâneos, imunológicos, neurológicos, ambientais, contribuem em variados graus para sua manifestação (WILHEM; KOVALIK; FAVROT, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; GEDON & MUELLER, 2018; SANTORO, 2019).

Além da hipersensibilização a alérgenos ambientais, uma disfunção da barreira cutânea foi proposta como fator crucial na patogenia da doença. Alterações na barreira cutânea como: deficiências qualitativas e quantitativas das lamelas lipídicas do estrato córneo, deficiência de ceramidas, alterações na filagrina, aumento da perda transepidérmica já foram identificadas em animais com dermatite atópica e correlacionadas com maior hipersensibilização (INMAN et al., 2001; REITER; TORRES; WERTZ, 2009; MARSELLA; SAMUELSON; HARRINGTON, 2009; HIGHTOWER et al., 2010; MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011; CHERMPRAPAIS et al., 2018).

Além das alterações observadas no componente lipídico, atualmente reconhece-se a importância da proteína estrutural filagrina na manutenção da integridade da barreira cutânea. Alterações na concentração da proteína filagrina são reconhecidas como importante fator na patogenia da dermatite atópica em

humanos e sua importância tem sido investigada em medicina veterinária (HOWELL et al., 2007; PALMER et al., 2006; MARSELLA; SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; SANTORO; MARSELLA; BURNICK, 2010; MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011).

Os cães com dermatite atópica são caracterizados pela presença de prurido de natureza crônica, primária, frequentemente perene, lesional ou alesional, de intensidade variando de leve, moderada ou grave (GRIFFIN & DEBOER, 2001; HILL et. al. 2006; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL; 2013). O prurido *sine* matéria, é frequentemente o primeiro sinal da doença. A presença da inflamação da pele, traduzido pelo eritema, e das infecções recorrentes na pele por leveduras e bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. compõe o quadro de dermatite atópica (SANTORO & HOFFMAN, 2016; SANTORO, 2019).

O diagnóstico da DAC é complexo, essencialmente clínico e estabelecido pela exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e alergopatias, como a dermatite alérgica à picada de ectoparasitas (DAPE) e à hipersensibilidade alimentar. Critérios diagnósticos são utilizados de forma a orientar o diagnóstico de dermatite atópica e são aplicados somente após a exaustão das possíveis causas de prurido. Atualmente, os critérios de Favrot, são utilizados internacionalmente para este fim (FAVROT et al., 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL; 2013). Os testes alérgicos, seja de qualquer natureza, não são recomendados para a consecução do diagnóstico inicial de atopia, somente para seleção de alérgenos para elaboração de imunoterapia alérgeno específica (HILLIER, 2002; OLIVRY et al., 2010).

A DAC é reconhecida pela hiper-reatividade do sistema imunológico com vários mecanismos de ação do sistema imune ativado. Além da hipersensibilização mediada pelas IgE, os animais atópicos apresentam uma importante ativação da resposta linfocitária, com padrão misto de expressão de resposta TH1/TH2 dependendo fase de evolução da doença. A ativação dos linfócitos T helper culmina produção de diversas citocinas inflamatórias, dentre elas a IL31, uma importante citocina pruridogênica, responsável em grande parte pelo desencadeamento do prurido. Cães com dermatite atópica também apresentam uma diminuição dos linfócitos T regulatórios cutâneos. Todas estas

alterações resultam na inflamação cutânea responsável pelas manifestações clínicas da DAC (NUTALL et al., 2002a; NUTALL et al., 2002b; HOMEY et al., 2006; MERRIMAN-SYMPSON et al., 2008; PUCHEU-HASTON et al., 2015).

A DAC é uma doença crônica, considerada incurável, e o tratamento visa estabelecer o controle da doença e a melhoria do bem-estar animal. O tratamento é multifatorial e objetiva a diminuição do estímulo do sistema imunológico. Para tanto, emprega-se medidas preventivas de exposição à alérgenos ambientais, controle de ectoparasitas, controle das infecções secundárias por leveduras e bactérias, recomposição da barreira cutânea; e por fim, terapias anti-inflamatórias e antipruriginosas, com uso de fármacos de caráter imunomoduladores, como: glicocorticoides, ciclosporina, oclacitinibe, lokivetmab (OLIVRY et al., 2010; OLIVRY et al., 2015; SOUZA, et al., 2018; SANTORO, 2019).

Na maior parte dos cães, o uso de fármacos imunomoduladores se faz necessário para o controle da doença. O uso crônico destes medicamentos pode acarretar efeitos colaterais importantes e, em algumas ocasiões, inaceitáveis. Em alguns casos a DAC pode ter caráter recalcitrante. O alto custo dos medicamentos, principalmente dos fármacos considerados mais seguros, pode ser impeditivo para o tratamento de parte dos cães (OLIVRY et al., 2010; OLIVRY et al., 2015; GEDON & MUELLER, 2019).

A imunoterapia alérgeno específica, diferentemente dos fármacos empregados na DAC, é considerada como única modalidade de tratamento, que permite o controle da doença por meio da modulação a resposta imunológica pela dessensibilização, sem o uso de fármacos, entretanto, seus custos, sua lenta resposta terapêutica e sua baixa eficácia comparada aos outros tratamentos desencorajam muitas vezes o seu emprego (GRIFFIN & HILLIER, 2001; HILLIER, 2002; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; OLIVRY et al., 2015).

Em virtude disso, existe a necessidade vigente de outras modalidades terapêuticas que apresentem como características: mínimos efeitos colaterais, melhor controle da doença, e tratamentos de ação mais duradoura que a proporcionada pelos medicamentos, que necessitam ser administrados

diariamente, de forma a melhorar a qualidade e bem estar animal (OLIVRY et al.; 2015; KINGLER, 2018; SANTORO, 2019).

As células-troncos são células indiferenciadas, presentes em distintos órgãos do organismo, participando do processo fisiológico de reparação celular dos tecidos de mamíferos. Além da capacidade de regeneração, as células-tronco podem se diferenciar em um tecido ou órgão específico com funções especializadas como: músculo, ossos, células hematopoiéticas ou nervosas. Estas características peculiares distinguem as células-troncos de qualquer outro tipo celular (KUMAR & SINGH, 2006; WEBSTER et al.; 2013; HARMAN et al., 2013; GUGJOO et al., 2019).

As células-tronco podem ser de origem embrionárias ou somáticas. Embora as célula-tronco de origem embrionária tenham maior capacidade de diferenciação (plasticidade), seu uso é associado ao risco de mutações, formação de tumores, além do envolvimento de questões éticas e morais que desencorajam o seu uso (RASMUSSEN, 2006; AMARIGLIO et al., 2009; WEBSTER et al., 2010). Já as células-tronco de tecidos adultos, apresentam menor plasticidade, entretanto, não são associadas com questões éticas, formações de tumores e são obtidas facilmente de tecidos adultos, o que viabiliza o seu uso terapêutico. As células tronco-adultos podem ter origem hematopoiética, obtidas a partir do estroma da medula óssea, ou mesenquimais, quando oriundas do tecido adiposo, ósseo, muscular e parede do cordão umbilical (WEBSTER et al., 2010; HARMAN et al., 2013; GUGJOO et al. 2019; QUIMBY, 2019).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células consideradas imunoevasivas, pois não expressam MHC classe II, não expressam moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, CD86, expressam minimamente moléculas de MHC classe I. Estas características das CTM viabilizam seu uso terapêutico, permitindo que seja utilizada de forma heterólogo, ou seja, em indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente distintos. Possuem ação antifibrótica, angiogênica, antiapoptótica, potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, sendo estas consideradas como mais relevantes para o seu uso terapêutico em diversas condições clínicas. As CTM exercem sua ação anti-inflamatória e

imunossupressora através de distintos mecanismos, possuem tropismo para sítios inflamados, e através da sua potente atividade secretória (ação parácrina) são capazes de alterar o microambiente local em que se incorporam orquestrando o processo de imunomodulação através das interações com o sistema imune inato e adaptativo (AGGARWAL & PITTENGER, 2015; RASMUSSEN, 2006; DUFFY et. al, 2011; LELBACHER & HENSCHLER, 2016).

Diante das propriedades de potente ação anti-inflamatória e imunossupressora das células-troncos e de seu vasto potencial de aplicação, estudos em medicina e mais recentemente em medicina veterinária, tem apontado a terapia com as células-troncos como um possível recurso terapêutico no tratamento de doenças de caráter crônico inflamatórias e degenerativas, entre elas a alergopatias, sendo necessária a realização de mais pesquisas que desnudem todo seu potencial terapêutico e aplicabilidade no manejo das doenças (WEBSTER et al., 2013; CHOW et al., 2017; GUGJOO; AMARRAL; SHARMA, 2019).

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Aspectos gerais da dermatite atópica

A dermatite atópica é uma dermatopatia de ordem inflamatória, essencialmente pruriginosa e incurável. É associada a alterações na barreira cutânea e à predisposição genética ao desenvolvimento de reação de hipersensibilidade cutânea do tipo I a alérgenos ambientais (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; OLIVRY et al., 2001)

No entanto, em uma parcela de cães, à semelhança do que ocorre na medicina, reconhece-se a ocorrência da dermatite atópica símile, ou dermatite atópica intrínseca (DAI), nomenclatura empregada para designar cães com manifestações clínicas idênticas à DA, porém na qual, não se observa a produção de imunoglobulina IgE alérgeno-específicas (OLIVRY, et al.; 2001; HALIWELL, 2006; OLIVRY et al., 2010; FAVROT et al., 2010). No momento, é incerto se a DAI, trata-se de entidade distinta ou apenas uma fase precoce à sensibilização e produção de IgE alérgeno-específicas. Em cães, esta forma da dermatite atópica é menos frequente que em medicina, possivelmente devido ao fato do diagnóstico ser mais tardio naquela espécie (MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; OLIVRY et al., 2001; MARSELLA, DE BENEDETTO, 2017). A ocorrência da DAI é incerta, com alguns estudos mostrando uma incidência de 14,6 a 25,6% dentre os cães atópicos. Além da impossibilidade de tratamento com imunoterapia alérgeno específica, é desconhecido se a resposta terapêutica a outras modalidades de tratamentos é similar aos cães com dermatite atópica clássica (BOTONI et al.; 2019; SANTORO, 2019).

Em virtude destas distintas formas de manifestação da DA, em 2001 o Colégio Americano de Dermatologia Veterinária, através do trabalho de “Task Force” definiu a dermatite atópica como uma doença alérgica inflamatória e pruriginosa em animais geneticamente predispostos com manifestações clínicas características, associada na maior parte das vezes com imunoglobulinas tipo E a alérgenos ambientais. Esta definição enfatiza que as características clínicas são importantes para o diagnóstico desta condição, e que a hipersensibilidade nem sempre estará presente (OLIVRY et al., 2001).

Haliwell (2006) conceituou ainda que, a hipersensibilidade não ocorre exclusivamente a alérgenos ambientais, e que outros fatores como: alimentos, antígenos de bactérias e leveduras podem estar envolvidos na patogenia da doença. Marsella & De Benedetto (2017) propõe que a dermatite atópica é um diagnóstico clínico e não se refere à natureza dos alérgenos, portanto, a separação entre alergia alimentar e ambiental não seria mais considerada adequada. Santoro (2019) relata que devido a diversidade das manifestações clínicas, a DAC deve ser classificada como uma síndrome em vez de uma simples dermatopatia inflamatória, assim como proposto em medicina.

A DAC deve ser compreendida, como uma doença complexa, multifatorial, na qual as interações entre fatores genéticos, cutâneos, imunológicos, neurológicos e ambientais, contribuem em variados graus na sua forma de manifestação (MARSELA & SOUZA 2001; WILHEM; KOVALIK; FAVROT, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013; GEDEON & MUELLER, 2018; SANTORO, 2019). Em animais que a hipersensibilidade tipo 1 a alérgenos ambientais não está presente, outros fatores são associados ao desenvolvimento da doença em indivíduos geneticamente predispostos, como: disfunção da barreira epidérmica; produção deficiente de peptídeos antimicrobianos pelas células epidérmicas, presença de superantígenos microbianos aumentando a susceptibilidade à infecções bacterianas e influências das condições ambientais (DEBOER, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013; SANTORO & HOFFMAN, 2016).

Dentre os diversos fatores ambientais que contribuem para a diversidade da manifestação clínica da doença, citam-se aqueles que influenciam o tempo e a intensidade de exposição aos aeroalérgenos, como: localização geográfica, condições climáticas (temperatura e umidade), radiação ultravioleta e o meio de vida do animal em ambiente intra ou extradomiciliar (GRIFFIN & DEBOER, 2001; HILLIER & GRIFFIN, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013).

Os alérgenos ambientais comumente associados com a dermatite atópica constituem principalmente os ácaros intradomiciliares, presentes na poeira doméstica; os esporos de fungos e pólenes de gramíneas, arbustos e árvores, e assumem diferentes graus de importância de acordo com a localização geográfica (HILL & DEBOER, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013;). Além

dos alérgenos ambientais, foi demonstrado que antígenos de *Staphylococcus pseudointermedius* e de *Malassezia pachydermatis*, são capazes de incitar ou perpetuar as manifestações clínicas de atopia (FAVROT, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; OLIVRY, et al., 2015).

A sensibilização aos alérgenos ambientais ocorre por diferentes vias de exposição, quer oral, inalatória e percutânea, sendo esta última considerada como de maior importância para a manifestação da doença. Em um estudo foi demonstrado que alérgenos com penetração epicutânea são capazes de desencadear lesões mais graves e persistentes que as outras vias, mesmo após a suspensão de sua exposição. Entretanto, as outras vias de exposição também são capazes de incitar semelhante distribuição lesional, sugerindo que ou estas áreas se tornaram previamente sensibilizadas pela exposição percutânea, ou que de fato, são áreas mais predispostas a manifestar lesões (MARSELLA & SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; MARSELLA; NICKLIN; LOPEZ, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

A observação de que a penetração percutânea é mais significativa para o desenvolvimento das manifestações clínicas da dermatite atópica, levou ao questionamento dos motivos pelos quais áreas não susceptíveis ao contato com alérgenos, como por exemplo: regiões flexurais, são predispostas a manifestar lesões, semelhantemente a áreas de maior exposição, como: orelhas, interdígitos e face; sugerindo que outros fatores associados a particularidades da pele, possam contribuir para a manifestação da doença em cães geneticamente predispostos (MARSELLA; NICKLIN; LOPEZ, 2001; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009).

A disfunção da barreira cutânea tem sido proposta como fator crucial na patogenia da doença. Em cães atópicos, à semelhança do que ocorre em medicina, foram observadas alterações na barreira cutânea como: deficiências qualitativas e quantitativas das lamelas lipídicas intercelulares do estrato córneo, deficiência de ceramidas e alterações na filagrina, principal proteína estrutural da epiderme (FARTASCH; BASSUKAS; DIEPGEN, 1992; CHOI & MAIBACH, 2005; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009, CHERMPRAPAI et al., 2018).

Estas anormalidades da barreira cutânea permitiriam maior penetração percutânea de alérgenos ambientais, irritantes primários, antígenos bacterianos, com conseqüente, maior exposição destes às células epidérmicas, como as células de Langerhans, estimulando o sistema imunológico e eliciando a resposta inflamatória característica da dermatite atópica (INMAN et al., 2001; CORK et al., 2006; OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2012).

## **1.2. Aspectos epidemiológicos e clínicos da dermatite atópica**

Em medicina, a dermatite atópica é considerada uma importante dermatopatia, com aumento crescente em sua prevalência, o que é atribuído à rápida industrialização da sociedade moderna, sendo mais prevalente em países industrializados e em áreas urbanas. A dermatite atópica afeta cerca de 20% das crianças e 10% dos adultos. Pacientes com dermatite atópica, principalmente do tipo moderada a grave, sofrem de significativo distúrbio de sono, depressão e ansiedade, o que implica em encargos psicológicos e socioeconômicos consideráveis nos pacientes e seus familiares. Por isso, em medicina, as dermatoses, dentre elas a dermatite atópica, são consideradas de grande importância em saúde pública, não somente pela alta prevalência e cronicidade, mas também por causarem sintomas que frequentemente levam desfiguração, incapacidade, e complicações, que podem resultar em consideráveis encargos fisiopsicológicos e financeiros (AKDIS et al., 2006; MCNALLY; PHILLIPS; WILLIAMS, 1998; SHIN, et al., 2017; GEDEON & MUELLER, 2019).

Em cães, a dermatite atópica é também uma importante dermatopatia, sendo considerada como segunda maior causa de alergia em cães (MARSELLA; SAMUELSON; HARRINGTON, 2009). Estima-se que a prevalência da DAC é entre 10 a 15 % da população canina e de até 58% da população canina que apresenta algum tipo de dermatopatia (HILLIER & GRIFFIN, 2001; HILL et al., 2006). É considerada uma importante dermatose, tanto pela sua crescente prevalência na população canina, quanto pelo impacto na qualidade de vida e bem-estar dos animais acometidos, e conseqüentemente, na vida dos seus respectivos tutores, implicando em numerosos gastos, esforços e necessidade de acompanhamento médico veterinário constante para controle da doença (HILLIER & GRIFFIN, 2001; LINEK & FAVROT, 2010; MILLER; GRIFFIN;

CAMPBELL, 2013). O aumento da prevalência da dermatite atópica em pacientes humanos e caninos, pode ser atribuído em parte, a maior permanência de tempo em ambiente intradomiciliares, que favorecem maior exposição aos ácaros da poeira doméstica, reconhecidos como importantes deflagradores de crises atópicas (MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009).

As primeiras manifestações clínicas da DAC iniciam em idade tenra, com a maior parte dos casos, entre seis meses a três anos de idade (HILL, et al., 2006; GRIFFIN & DEBOER, 2001). Em um estudo envolvendo muitos animais, a idade média de acometimento da doença foi de 2,2 anos, com 68% dos animais manifestando os primeiros sinais da doença antes dos três anos de idade (FAVROT et al., 2010). Entretanto, há relatos da doença acometendo animais tão novos quanto 4 meses de idade e até mesmo em cães com idade superior a 7 anos (GRIFFIN & DEBOER, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Animais com definição racial são os mais acometidos, sendo determinadas raças apontadas como predispostas. Entretanto, em muitos estudos, a análise do padrão racial não foi avaliada concomitantemente com a prevalência regional da raça. Raças como: beaucerons, boston berriers, boxers, bulldogue inglês, bulldogue francês, cairn terrier, sharpei, cocker spaniel, dálmatas, fox terrier, golden retriever, jack russel terrier, labrador retriever, lhasa apso, west highland white terrier (WHWT), pastor alemão, pug, schnauzer miniatura, terrier escocês, setter inglês, yorkshire terrier, fox terrier de pelo duro, foram reportadas como predispostas, entretanto, a variabilidade da prevalência racial nas diferentes regiões geográficas dificultam a análise e conclusão sobre a predisposição racial. Em relação à caracterização sexual, até o momento, não foi observada distinção sexual significativa entre os animais acometidos (HILLIER & GRIFFIN, 2001; GRIFFIN & DEBOER, 2001; HILL et al., 2006; WILHEN; KAVOLIK; FAVROT, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

De forma geral, os cães com dermatite atópica são caracterizados pela presença de prurido de natureza crônica, primária, frequentemente perene, lesional ou alesional, de intensidade variando de leve nos estágios iniciais da doença, até moderada a grave (GRIFFIN & DEBOER, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). A presença da inflamação da pele e das infecções recorrentes

compõe o quadro de dermatite atópica (SANTORO et al., 2015; SANTORO, 2019).

O prurido *sine* matéria, também chamado de alesional, é frequentemente o primeiro sinal da doença. Em mais de 70% dos casos, o prurido de cães atópicos é responsivo aos glicocorticoides. O prurido é o principal sintoma de cães atópicos, e se manifesta por vários comportamentos, como: prurido perianal, lambedura e/ou mordiscamento das patas e do corpo, roçar em móveis, tapetes e paredes, coçar com as patas, presença de lesões auto-infligidas como erosões, escoriações, arrancamento de pelos e dermatite piotraumática. Após o prurido, o eritema, pela inflamação da pele, é a lesão classicamente associada à dermatite atópica (GRIFFIN & DEBOER, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

A distribuição clássica das lesões de dermatite atópica é comum tanto em pacientes caninos como humanos. Áreas glabras e propensas à dermatite de contato são mais susceptíveis. Regiões tipicamente afetadas em ambas as espécies incluem: periocular, perioral, flexuras, axilas e região inguinal (GRIFFIN & DEBOER, 2001; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MARSELLA & DE BENEDETTO, 2017).

Em um estudo com grande número de animais, as regiões mais acometidas foram as patas, axilas, abdômen e pavilhões auriculares. A otite externa crônica foi detectada em 43% dos cães, em alguns casos antecedendo as outras manifestações da atopia (FAVROT et al., 2010). Outras regiões como: periocular, perilabial, flexura cubital, região inguinal e perineal são frequentemente acometidas. Estas áreas podem apresentar eritema leve a intenso, xerose e distintos graus de ceratose. Frequentemente, instalam-se infecções estafilocócicas e por leveduras do gênero *Malassezia sp.*, as quais acentuam a inflamação e o prurido, agravando o quadro do animal. Em alguns animais, nas fases iniciais da doença, o prurido pode se manifestar somente na presença destas infecções secundárias (GRIFFIN & DEBOER, 2001; OLIVRY et al., 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Menos frequentemente, manifestações de urticária, rinite, dermatite úmida aguda, hiperhidrose, seborreia, fístulas interdigitais, dermatite acral por

lambedura, são associadas com dermatite atópica (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; FAVROT et al., 2010). Com a cronicidade do quadro, ocorrem alterações na consistência da epiderme com conseqüente hiperqueratose, acantose e, por fim, lignificação. Pacientes com dermatite atópica podem ainda apresentar outros quadros alérgicos concomitantes como a hipersensibilidade à picada de insetos, dermatite trofoalérgica e dermatite de contato (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; FAVROT et al.; OLIVRY et al., 2010).

Embora as manifestações da dermatite atópica possam apresentar variabilidade racial e individual, certas características da doença parecem ser comuns entre as distintas raças como: boa resposta aos glicocorticoides, infecções bacterianas crônico-recorrentes e conjuntivites. Algumas manifestações lesionais, entretanto, são associadas a determinadas raças como seborreia em pastores alemães e WHWT, urticárias e otites em boxers, malasseziose recorrente em WHWT, prurido alésional em pastores Alemães, sharpei, dálmatas, e xerose excessiva em labrador retriever (JAEGER et al., 2010; WILHEM; KAVOLIK; FAVROT, 2010).

A maior parte dos cães com dermatite atópica são intradomiciliares. As mudanças do ambiente podem resultar em piora ou melhora clínica em alguns animais. O mesmo pode ser observado em relação às estações do ano, com acentuação dos sintomas nos períodos de temperaturas mais quentes. Inicialmente, a doença pode assumir caráter sazonal conforme a exposição aos aeroalérgenos, entretanto, com a cronicidade, as manifestações clínicas tendem a evoluir de forma perene. Cães que residem em áreas de climas mais quentes com pólenes presentes durante todo o ano apresentam maior risco de manifestar sinais clínicos de forma mais precoce (GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010). Ocasionalmente, cães mais velhos podem manifestar dermatite atópica, nestes casos, mudanças para regiões de clima mais quente, com maior exposição a aeroalérgenos, podem ser atribuídas como causa da manifestação tardia nestes animais, em que os sinais acontecem em 1 a 3 anos após a mudança (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

### **1.3. Patogenia da Dermatite Atópica Canina**

Embora a dermatite atópica seja uma doença comum e crescente, o entendimento de sua fisiopatogenia ainda não é totalmente compreendido. É uma doença complexa, multifatorial, na qual as interações entre fatores genéticos, cutâneos, imunológicos, neurológicos e ambientais, contribuem em variados graus na sua forma de manifestação (MARSELA & SOUZA 2001; WILHEM; KOVALIK; FAVROT, 2010; GEDEON & MUELLER, 2019).

#### **1.3.1. A importância da barreira cutânea na patogenia da dermatite atópica canina**

O estrato córneo da pele canina é composto por queratinócitos e abundantes lipídeos, os quais são cruciais na formação e na manutenção de uma barreira cutânea efetivamente protetora. A camada córnea é composta por cornéocitos, que são queratinócitos compactados, e pelas lamelas lipídicas, que preenchem o espaço intercelular, ambos responsáveis por manter a hidratação e proteção cutânea contra a penetração de agentes estranhos. (CORDECH et al., 2003; CHOI et al., 2005; MASUKAWA et al., 2008; MARSELLA; OLIVRY, CARLOTTI, 2011).

No interior dos queratinócitos, há organelas denominadas queratinossomas ou corpúsculos lamelares. Estas são formadas inicialmente na porção superior da camada espinhosa, e estão presentes em grande quantidade na camada granulosa. Nesta camada, os corpúsculos lamelares migram e se fundem com a membrana apical, liberando seu conteúdo para o espaço intercelular sob a forma de lamelas lipídicas (CODERCH et al., 2003; CHOI et al., 2005; MASUKAWA et al., 2008; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009).

As lamelas lipídicas são compostas principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres. A ceramida é o lipídeo mais abundante, correspondendo a aproximadamente 50% dos lipídeos do estrato córneo, sendo por este motivo, considerado como o lipídeo mais importante na preservação da função da barreira cutânea (CODERCH et al., 2003; CHOI et al., 2005; MASUKAWA et al., 2009).

As ceramidas compõem um grupo de lipídeos dérmicos heterogêneo, representado por 11 tipos de moléculas. São constituídas de uma forma geral por uma base de lipídeos esfingóides, como: esfingosina, dihidroesfingosina, fitoesfingosina, associados a um ácido graxo. A síntese de ceramidas é regulada a partir da camada basal, tão logo produzidas são rapidamente convertidas em glucosil-ceramidas e esfingomielinas e estocadas nos corpos lamelares. O equilíbrio entre as enzimas de síntese e degradação das ceramidas são responsáveis por manter suas concentrações no estrato córneo em níveis adequados. Uma vez liberadas sob a forma de lamelas lipídicas no estrato granuloso e córneo, são regeneradas através de hidrólise por enzimas como a beta-glucocerebrosidase e esfingomielinases, a fim de manter suas concentrações adequadas (HARA et al., 2000; JENSEN et al., 2004; IMOKAWA, 2009; MASUKAWA et al., 2008; MASUKAWA et al., 2009; MARSELLA, OLIVRY, CARLOTTI, 2011).

Em medicina, estudos conduzidos em paciente atópicos, evidenciaram desequilíbrio entre as distintas enzimas reguladoras da produção e degradação de ceramidas. Um aumento significativo das enzimas de degradação, como a esfingomielinases, foi detectado na pele lesional e alesional, quando comparados com indivíduos saudáveis, contribuindo para as reduções das concentrações de ceramidas no estrato córneo (HARA et al., 2000; JENSEN et al., 2004; IMOKAWA, 2009)

Em cães com dermatite atópica, estudos conduzidos para avaliar a barreira cutânea, detectaram diversas alterações focais na epiderme como: desorganização das lamelas lipídicas, aumento do espaço intercelular entre os corneócitos, alterações dos corpos lamelares no interior dos corneócitos, lipídeos amorfos intercelulares em grande quantidade, redução da espessura e uniformidade das lamelas lipídicas e alterações quantitativas e qualitativas das ceramidas em relação aos cães saudáveis, (INMAN et al., 2001; SHIMADA et al., 2008; REITER; TORRES; WERTZ, 2009; MARSELLA; SAMUELSON; DEBOER, 2010; GHERMPRAPAI et al., 2018).

A mensuração da perda de água transepidérmica (PATE) é uma forma de avaliação não invasiva da integridade da barreira cutânea. Um aumento da

PATE sugere desidratação cutânea e foi associada com deficiência de lipídeos dérmicos (FARTASCH; BASSUKAS; DIEPGEN, 1992; SHIMADA et al., 2009). Em cães, a mensuração da PATE apresenta uma maior variabilidade que em medicina. Os poucos estudos conduzidos até agora apontam para a existência de alteração na barreira cutânea, como verificado por Hightower et al., (2010) em uma colônia de Beagles atópicos, que apresentaram valores de PATE superiores a cães hígidos do grupo controle de igual raça e idade. O aumento da PATE em cães atópicos foi observado anteriormente ao desafio alergênico e mesmo na ausência de evidência clínica de lesões de dermatite atópica, o que sugere que os defeitos da epiderme neste modelo experimental são primários e que as regiões predispostas à dermatite atópica são mais permeáveis.

Estudos em cães com dermatite atópica apontam uma diminuição das concentrações de ceramidas na pele, inclusive em áreas sem lesões, quando comparadas a animais hígidos. Além da diminuição das ceramidas, em especial dos tipos 1 e 9, outros lipídeos e aminoácidos hidrossolúveis também apresentam concentrações reduzidas. Os níveis de colesterol e ácidos graxos nem sempre apresentam alterações consistentes na pele (SHIMADA et al., 2008; REITER; TORRES; WERTZ, 2009; GHERMPRAPAI et al., 2018).

Além das alterações observadas no componente lipídico, atualmente reconhece-se a importância de proteínas estruturais da epiderme na patogenia da dermatite atópica. A filagrina é uma das proteínas estruturais mais importantes da epiderme, constituindo juntamente com a queratina, uma matriz lipoproteica, que juntas formam o envelope celular da camada córnea, responsável por manter a coesão celular e a hidratação, protegendo o organismo de injúrias externas. A partir da degradação da filagrina são formados polímeros denominados, fator de hidratação natural da epiderme (FHNE) responsáveis pela manutenção da hidratação cutânea (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2001; MARSELLA, SANTORO, 2010; OLIVRY; CARLOTTI, 2011; MARSELLA, 2013).

Em medicina, alterações na concentração da proteína filagrina são reconhecidas como importante fator na patogenia da dermatite atópica. Mutações nos genes codificadores de filagrina são associadas com maior risco para o desenvolvimento da doença. Estas mutações levam à alteração na

porção-C do gene da filagrina e são associadas com perda da função de barreira cutânea e aumento do risco de sensibilização alérgica e manifestação de doença grave e precoce (NEMOTO-HASEBE et al., 2009; VAN DEN OORD, SHEIK, 2009; KAWASAKI et al., 2011).

Entretanto, as concentrações de filagrina na epiderme podem ser influenciadas não somente por mutações genéticas, mas também pelo processo inflamatório que apresenta uma complexa interpelação com a barreira cutânea. A subexpressão de filagrina em alguns pacientes pode ser secundária à resposta inflamatória mediada por citocinas do tipo TH2, presentes principalmente na fase aguda da doença, que podem desencadear modificações epigenéticas, diminuindo sua produção. Desta forma, a diminuição da filagrina, pode ser relevante até mesmo quando mutações em seu gene sejam indetectáveis (HOWELL et al., 2007; MARSELLA; SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; KAWASAKI et al., 2011; MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011).

Em medicina veterinária, é pequeno o número de trabalhos sobre a filagrina e sua associação com a dermatite atópica. Um estudo realizado por meio de imunistoquímica, em cães atópicos da raça Beagle, demonstrou quantidade significativamente menor de filagrina quando comparados com controles hígidos (MARSELLA; SAMUELSON; HARRINGTON, 2009). Santoro, Marsella, Burnick (2010) observaram distribuição homogênea de filagrina no estrato córneo de cães saudáveis, enquanto cães atópicos apresentaram um padrão de distribuição irregular após a exposição de alérgenos de ácaros da poeira doméstica, sugerindo que estas alterações poderiam ser secundárias à inflamação. Estudos realizados em cães da raça WHWT foram incapazes de associar mutações genéticas no gene de filagrina associadas às manifestações de DA (BARROS; ROQUE, O'LEARY, KYAW-TANNER, 2009; MARSELLA, OLIVRY, CARLOTTY, 2011; MARSELLA, 2013).

Além da filagrina, outras mutações genéticas foram identificadas em genes que codificam proteases e inibidores de proteases da epiderme. A descamação epidérmica tem a função de permitir sua renovação ao mesmo tempo em que mantêm sua integridade, de forma a prevenir a desidratação e a penetração de substâncias estranhas. O processo de disqueratinização é controlado pelo equilíbrio entre uma combinação de proteases e inibidores de proteases, como serinas, cisteínas, catepsinas e proteases aspárticas. Enzimas

importantes como enzima quimiotripsínica do estrato córneo (SCCE) e enzima tríptica do estrato córneo (SCTE), atuam na hidrólise de corneodesmosomas como: desmosinas, desmocolinas e desmogleína-1, responsáveis por manter a coesão entre os queratinócitos. Mutações nos genes associados ao processo de queratinização: KLK7/SCTE, SCCE, SPINK 5 já foram identificadas em paciente humanos atópicos (CAUBET et al., 2004; BADERTSCHER et al., 2005; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009).

É reconhecido que em pacientes humanos atópicos, há aumento da atividade de enzimas proteolíticas e aumento da esfoliação epidérmica. O incremento da atividade de proteases foi correlacionado com estágios clínicos da dermatite atópica, da mesma forma que a redução de seus níveis foi correlacionada com a regressão da doença. Entretanto, até o momento, não é possível distinguir se o aumento das proteases é um fator primário ou apenas um marcador da doença, isso porque as proteases também são produzidas por células inflamatórias como mastócitos e encontradas em outras condições na qual a barreira epidérmica está comprometida (BADERTSCHER et al., 2005; MARSELLA; OLIVRY, CARLOTTI, 2011).

Em medicina veterinária, poucos são os estudos investigando o papel das proteases na dermatite atópica. Um estudo pesquisando a transcrição genética em biópsias de cães atópicos reportaram diferenças significativas na expressão de RNA mensageiro entre cães saudáveis e atópicos para os genes SPINK5, proteases I de mastócitos, dipeptidil-peptidase 4, fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato-5-fosfatase-2 e esfingosina-1-fosfato liase-1, entretanto, não foi possível estabelecer se estas diferenças são alterações primárias ou decorrentes do processo inflamatório. Na pele lesional de cães com DA atópica, também foi encontrado uma superexpressão no gene S100A8. Este gene que codifica uma proteína responsável por várias ações: cicatrização e feridas, quimiotaxia de células inflamatórias, defesa contra microrganismos. Neste estudo, a expressão deste gene foi 23 vezes maior em cães atópicos (WOOD et al., 2009). Além deste, uma variedade de outros genes associados com a resposta imune inata e adquirida, ciclo celular, apoptose, barreira cutânea e fatores de regulação transcricional foram reportados associados com a dermatite atópica (MERRYMAN, SIMPSON, 2001).

Todas estas alterações microestruturais, na pele lesional e alesional, descritas na dermatite atópica, são associadas com: maior penetração antigênica, maior reconhecimento de antígenos pelas células epidérmicas, com o desencadeamento de resposta inflamatória e estímulo sensorial para o prurido. O prurido, por sua vez, após induzido, produz injúria aos queratinócitos, que por suas funções efetoras determinam a direção da resposta imune tegumentar, perpetuando as alterações da dermatite atópica. Tem sido alvo de discussão e investigação, se as alterações de barreira cutânea são primárias ou secundárias ao curso da doença. Entretanto, uma vez a barreira cutânea é agredida e o processo de sensibilização instalado, quer de forma primária ou secundária pela inflamação, há o avanço da doença com amplificação das alterações, o que se acredita que também ocorra em medicina veterinária (NUTTAL et al., 2002; HOMEY et al., 2006; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; MARSELLA, 2013; KIDO-NAKAHARA et al., 2017).

### **1.3.2. O papel do sistema imunológico na patogenia da dermatite atópica canina**

Após a penetração percutânea, os diferentes antígenos são fagocitados pelas células de Langerhans epiteliais, e apresentados aos linfócitos Th0 no linfonodo regional, onde mediante características genótípicas e exposição de certas citocinas como IL4, se diferenciam em linfócitos tipo Th2. Estes por sua vez, estimulam a produção de linfócitos B, que após diferenciação em plasmócitos, produzem imunoglobulinas IgE alérgeno-específicas, as quais se distribuem então na superfície de mastócitos e células de Langerhans dérmicas (HOMEY et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al. 2015).

Na dermatite atópica, os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos, são cruciais para o desenvolvimento da doença. As células de Langerhans e células dendríticas dérmicas, expressam receptores de alta afinidade para IgE (FCERI) e estão presentes em maior número em pacientes atópicos, facilitando a apresentação de antígenos e estimulação dos linfócitos T. Os linfócitos após sensibilizados migram para a epiderme, na qual diante de um novo contato, rapidamente incitam resposta inflamatória pela produção de IgE e

ativação de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (HOMEY et al., 2006; PUCHEU-HASTON et al. 2015).

A sensibilização prévia de mastócitos e células de Langerhans dérmicas, amplificam a resposta inflamatória, por recrutar e degranular mastócitos, basófilos e neutrófilos, os quais liberam mediadores inflamatórios, como: histamina, heparina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos entre outras, contribuindo na exacerbação da doença através do desencadeamento do prurido e do processo inflamatório (CARR et al., 2009; PUCHEU-HASTON et al. 2015; SHIN, TAE-HOON et al., 2017).

Classicamente, a patogenia da dermatite atópica é caracterizada por resposta inflamatória anormal mediada predominantemente pela expressão de citocinas inflamatórias de perfil Th2, como: IL4, IL5, IL6, IL13, aumento sérico de imunoglobulinas IgE alérgenos-específicas e a presença de eosinófilos. Em pacientes atópicos, também é reportada a diminuição de linfócitos T reguladores e a subexpressão de citocinas imunossupressoras, como a TGF-beta e IL10, consideradas como alterações importantes na instalação e manutenção da doença. Atualmente, reconhece-se que a na dermatite atópica há um padrão misto de inflamação, sendo as fases iniciais, aguda da doença, caracterizada pela predominância de linfócitos Th2 e Th22, e a fase crônica da doença com a ação de linfócitos TH1, caracterizado pela produção de citocinas como IFN-gama, TNF-alfa, IL2 (OLIVRY et al., 1999; NUTALL et al., 2002; SCHOLLOTER, et al, 2011; SHIN, TAE-HOON et al., 2017).

No cão, vários mediadores e citocinas inflamatórias estão associados ao desenvolvimento da inflamação e desencadeamento do prurido, a histamina, porém, não parece ter um papel tão importante em cães como em humanos e em camundongos. Recentemente, uma importante interleucina, denominada IL31, foi descoberta, sendo atribuída como responsável pelo estímulo sensorial nervoso e desencadeamento do prurido. Esta interleucina é produzida pelos linfócitos T-helper cutâneos sensibilizados, e atua nos receptores do tipo Janus quinase JACK do tipo 1, presentes nas fibras nervosas sensoriais da pele, capazes de desencadear o prurido. Por meio deste mesmo receptor, esta citocina também estimula queratinócitos, linfócitos, macrófagos, neutrófilos e

eosinófilos, amplificando a resposta inflamatória (GONZALES et al., 2013; DILLON et al., 2004). A exposição prolongada desta citocina é associada com aumento da expressão de fibras nervosas sensoriais, amplificando assim o estímulo sensorial necessário para o desencadeamento do prurido (SONKOLY et al., 2006).

#### **1.4. Diagnóstico da Dermatite Atópica Canina**

O diagnóstico de dermatite atópica é complexo, essencialmente clínico e estabelecido pela exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e alérgicas como dermatite alérgica à picada de ectoparasitas e a hipersensibilidade alimentar (FAVROT et al., 2010).

Critérios diagnósticos têm sido desenvolvidos ao longo do tempo, de forma a orientar o diagnóstico de dermatite atópica. Dentre todos os critérios propostos até a atualidade, os de Favrot (2010) têm sido atualmente recomendados, devido ao fato dos critérios utilizados anteriormente, como os de Willemse e os de Prelaud, carecerem de validação estatística, ou serem limitados geograficamente ou quantitativamente. Em um estudo multicêntrico, conduzido com muitos cães, quando os critérios de Willemse e Prelaud foram submetidos à validação estatística apresentaram sensibilidade e especificidade inferiores que aos critérios de Favrot aplicados na mesma população (FAVROT et al., 2010). Entretanto, quaisquer critérios para diagnóstico de dermatite atópica, só devem ser empregados após a exclusão de outras dermatopatias pruriginosas não alérgicas e alérgicas como a DAPE e a alergia alimentar (FAVROT et al., 2010). Embora, as manifestações da dermatite atópica estejam sujeitas a variações individuais e raciais, foi demonstrado que esta variabilidade não implica em perda de acurácia significativa dos critérios estabelecidos por Favrot (WILHEN; KAVOLIK; FAVROT, 2010).

O diagnóstico da dermatite atópica, pode ser moroso levando-se em consideração as possíveis variações genéticas, as distintas manifestações clínicas associadas aos fenótipos raciais existentes, ao tempo de evolução da doença, a presença de infecções concomitantes e a coexistência de outros

quadros alérgicos. Acredita-se que aproximadamente 75% dos cães com dermatite atópica apresentam DAPE concomitante e que cerca de 20 – 30% podem apresentar hipersensibilidade alimentar. Desta forma, o uso dos critérios diagnósticos deve ser utilizado com cautela, levando-se em consideração todas as variáveis descritas acima (WILHEN; KAVALIK, FAVROT; 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013).

Os testes alérgicos, quer sorológicos ou intradérmicos, não são recomendados para a consecução do diagnóstico inicial de atopia, e sim para a identificação dos possíveis alérgenos envolvidos em animais onde o diagnóstico de dermatite atópica já foi estabelecido pela exclusão de todas as outras doenças de cunho pruriginoso. Isso deve-se à possibilidade de cães saudáveis apresentarem reações positivas a estes testes semelhantemente aos atópicos (HILLIER, 2008; OLIVRY et al., 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013).

Dentre os testes alérgicos disponíveis, o intradérmico, é considerado o padrão ouro. Por meio deste teste é possível detectar a presença de IgE alérgeno-específica na superfície de um mastócito sensibilizado na pele. (HILLIER, 2002; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013). Já os testes sorológicos demonstram a presença de imunoglobulina tipo IgE no sangue, e sua detecção indica tão somente prévia exposição à determinado alérgeno, não significando necessariamente que as manifestações clínicas sejam decorrentes deste achado. Os testes alérgicos sorológicos mais utilizados são o radioalergoabsorvente (RAST), ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Para a interpretação correta destes testes, é necessário que seja avaliado conjuntamente o histórico clínico detalhado do animal (AKDIS et al., 2006; DEBOER, 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013).

### **1.5. Tratamento da Dermatite Atópica Canina**

A dermatite atópica é uma doença crônica, complexa, considerada incurável, onde o tratamento visa estabelecer o controle da doença e melhora da qualidade e bem-estar de vida do animal específica (MILLER; GRIFFIN; CAMPBEL, 2013; OLIVRY et al., 2015).

O tratamento da dermatite atópica é multifatorial e abrange o uso de medidas preventivas de exposição à alérgenos, como forma de minimizar o estímulo do sistema imunológico. Desta forma, engloba o controle de ectoparasitas, o controle das infecções secundárias por leveduras e bactérias; a recomposição da barreira cutânea por meio da hidratação, a terapia anti-inflamatória e antipruriginosa pelo uso de fármacos imunomoduladores como: glicocorticoides, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab e, por fim, uso de imunoterapia alérgenos-específica e anticorpos monoclonais (OLIVRY et al., 2015; SANTORO, 2019).

Embora aconselhável, a minimização da exposição aos alérgenos é muitas vezes impraticável e por ora insuficiente para amenização dos sintomas de alergia. O controle das infestações por ectoparasitas e das infecções por bactérias, sobretudo do gênero *Staphylococcus* sp. e das leveduras *Malassezia* sp., são fundamentais visto que, são reconhecidas como importantes deflagradoras de crises de dermatite atópica, agravando os sintomas de alergia e diminuindo o efeito dos fármacos imunomoduladores (OLIVRY et al., 2010; OLIVRY et al, 2015).

O tratamento com repositores de barreira cutânea, com formulações tópicas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos na proporção de 3:1:1, similar a proporção naturalmente encontrada na pele, têm ganhado destaque no manejo terapêutico de cães atópicos. Estudos com agentes reparadores da barreira cutânea tem demonstrado ação benéfica no tratamento de cães com DA, por: reduzir a inflamação, melhorar a hidratação, aumentar as concentrações de ceramidas, reorganizar as lamelas lipídicas, diminuir a perda de água transepidermica. Juntas estas ações resultam na amenização das manifestações clínicas de cães com DA, diminuindo o escore lesional e de prurido em alguns estudos (PIEKUTOWSKA et al., 2008; FUJIMORA et al., 2011; JUNG et al., 2013; MARSELLA et al., 2013; SALVADOR, 2014; SANTORO, 2019). Outros agentes reparadores de barreira cutânea, como as esfingosinas, precursoras das ceramidas, são associadas com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, e parecem exercer um efeito benéfico na inflamação e proliferação celular (PIN et al., 2014; CERRATO et al., 2016).

O uso de anti-histamínicos, embora acessíveis e seguros têm se mostrado ao longo do tempo pouco eficaz para controle dos sintomas de cães atópicos, o que pode ser explicado pelo fato da histamina na DAC não ser o principal mediador da inflamação cutânea (OLIVRY et al., 2015; SANTORO, 2019)

Os fármacos imunomoduladores empregados para o tratamento da dermatite atópica apresentam ação sintomática, ou seja, permitem o controle das manifestações clínicas, sem, contudo, curar a doença, o que torna necessário o seu uso de forma crônica, tornando o tratamento oneroso e passível de efeitos colaterais, que muitas vezes podem ser inaceitáveis. Os glicocorticoides são medicamentos extremamente eficazes, de baixo custo de aquisição, entretanto, os efeitos colaterais com seu uso crônico desencorajam seu uso na terapia de manutenção, sendo recomendados somente para tratamento das crises agudas, por breve período de tempo (OLIVRY & SOUZA, 2001; OLIVRY, et al., 2010; OLIVRY et al., 2015). Já o oclacitinib (Apoquel<sup>®</sup>, Zoetis, EUA), um inibidor de janu-kinase 1 de rápida ação, e a ciclosporina (Sandimmun neoral<sup>®</sup>, Novartis, EUA), inibidor de calcineurina, são considerados como opções mais seguras em longo prazo. Entretanto, o alto custo destes medicamentos pode ser impeditivo para o tratamento de todos os cães. Além do alto custo, alguns cães podem não apresentar resposta favorável, outros ainda podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis e intoleráveis a estes fármacos (OLIVRY et al., 2015; SANTORO, 2019).

Recentemente, uma nova modalidade na terapêutica da DAC, é o uso do anticorpo monoclonal anti-IL31 (Cytoint<sup>®</sup>, Zoetis, EUA), o qual se liga a esta interleucina, indisponibilizando-a para a ligação com seu receptor, e desta forma impedindo a ativação da cascata inflamatória ativada por esta via. Estudos demonstram que este fármaco, além de seguro, é capaz de diminuir os sintomas da dermatite atópica em relação ao escore lesional e ao prurido por períodos tão prolongados como 8 semanas (MICHELS et al., 2016; MOYAERT et al., 2017; SOUZA et al., 2018; SANTORO, 2019).

A imunoterapia alérgeno-específica, diferentemente dos fármacos, atua na imunomodulação do sistema imunológico, gerando dessensibilização da resposta alérgica em longo prazo. Aumenta a produção de IgG em detrimento

das IgEs e aumenta a expressão de citocinas imunossupressoras como IL10 e TGF-beta. Atualmente, é considerada como única modalidade de tratamento capaz de promover a cura da doença, entretanto, é onerosa e morosa, tão lenta quanto doze meses para benefício notável, sendo reportada como eficiente em cerca de 20 a 60% dos casos. Como vantagem, tem-se o pequeno número reportado de efeitos colaterais, não apresentando contra indicações. A imunoterapia alérgenos-específica, pode se tornar mais eficaz, à medida que as técnicas de diagnóstico dos testes alérgicos sejam aperfeiçoadas, com padronização de extratos alergênicos mais apropriados que propiciem melhores valores de sensibilidade e especificidade (HILLIER, 2002; GRIFFIN & HILLIER, 2001; OLIVRY, et al.; 2015)

Em virtude disso, existe a necessidade vigente de outras modalidades terapêuticas que apresentem como características: mínimos efeitos colaterais, melhor controle da doença, tratamentos de ação mais duradoura, com resposta menos efêmera que a proporcionada pelos medicamentos que necessitam ser administrados diariamente, de forma a melhorar a qualidade e bem-estar animal e minimizar o impacto na vida de seus respectivos tutores (KINGLER, 2018; SANTORO, 2019).

Diante das características das células-troncos e seu vasto potencial de aplicação, estudos em medicina e mais recentemente em medicina veterinária, tem apontado a terapia com células-tronco como um possível recurso terapêutico com efeito terapêutico prolongado e poucos efeitos colaterais no tratamento de doenças crônicas inflamatórias, entre elas as alergopatias, sendo necessária a realização de mais pesquisas que desnudem todo seu potencial terapêutico e aplicabilidade no manejo das doenças (WEBSTER et al., 2012; HOFFMAN & DOW, 2016; KINGLER, 2018; QUIMBY et al., 2019, GUGJOO; AMARPAL; SHARMA, 2019).

## **1.6. Células-Tronco Mesenquimais**

As células-troncos estão presentes em distintos órgãos do organismo e participam do processo fisiológico de reparação celular de todos os tecidos de mamíferos. São células indiferenciadas dotadas de capacidade de regeneração pelo processo de divisão celular, mesmo após longos períodos em inatividade.

Em determinadas condições fisiológicas ou experimentais, as células-tronco podem se diferenciar em um tecido ou órgão específico com funções especializadas como, músculo, ossos, células hematopoiéticas ou nervosas. Estas características peculiares distinguem as células-troncos de qualquer outro tipo celular (KUMAR & SINGH, 2006; WEBSTER et al.; 2013; HARMAN et al., 2013; GUGJOO, et al., 2019).

As células-tronco podem ser embrionárias ou somáticas. As células de origem embrionárias são classificadas como totipotentes, quando obtidas a partir do zigoto, ou pluripotentes, quando obtidas a partir da massa interna do blastocisto, estas possuem alto potencial de regeneração e capacidade de diferenciação em qualquer célula do organismo. Entretanto, seu uso é associado ao risco terapêutico pela possibilidade de mutações e formação de tumores. Além disso, seu uso é controverso, devido a questões éticas e morais pelo uso de material embrionário (RASMUSSEN, 2006; AMARIGLIO et al., 2009; WEBSTER et al., 2010). As células-tronco de tecidos adultos por sua vez, são multipotentes, com capacidade de diferenciação em alguns tipos celulares. Estas células com capacidade de autorregeneração, não são associadas com questões éticas, pois são obtidas a partir de tecidos adultos já diferenciados. As células-tronco adultas podem ser obtidas a partir de tecidos distintos. Em medicina veterinária, os locais comuns de obtenção constituem medula óssea, tecido adiposo e sangue e tecido do cordão umbilical (HARMAN et al., 2013; WEBSTER et al., 2010; GUGJOO, et al. 2019; QUIMBY, 2019).

As células-tronco multipotentes podem ser de origem hematopoiética, obtidas do estroma da medula óssea ou sangue do cordão umbilical, ou mesenquimais, quando oriundas de tecidos musculares, ósseo, adiposo, e da parede do cordão umbilical. As células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco hematopoiéticas (CTH) apresentam maior relevância terapêutica, devido sua maior disponibilidade, plasticidade, capacidade de regeneração, diferenciação e facilidade de obtenção. O número de células tronco isoladas destes tecidos é variável. Células-tronco hematopoiéticas são encontradas na medula óssea e em pequeno número no sangue, dando origem a plaquetas, células vermelhas e células brancas, sendo capazes de originar qualquer célula componente do sangue. Embora CTH sejam relevantes em medicina, não são

empregadas para uso terapêutico em medicina veterinária (WEBSTER et al., 2010). Em contrapartida, o tecido adiposo é rico em células-tronco mesenquimais e estão presentes em maiores quantidades que na medula óssea. Sua obtenção é facilmente realizada a partir da excisão cirúrgica do tecido adiposo em região inguinal, abdominal e torácica em pequenos animais. São facilmente isoladas e cultivadas em cultura celular, estando presentes em grande quantidade no tecido adiposo, com cerca de  $5 \times 10^9$  células em 1 grama, cerca de 500 vezes mais que em 1 grama de tecido hematopoiético, o que faz com que este tecido seja preferido em relação aos outros (RASMUSSEN, 2006; WEBSTER, 2010; AGGARWAL & PITTENDER, 2015).

As CTM podem se diferenciar em vários tipos celulares como adipócitos, cartilagem, ossos e músculos; são imunocompatíveis e apresentam efeitos imunoregulatórios, características estas desejáveis para uso terapêutico (RASMUSSEN, 2006; WEBSTER et al., 2010; TAEHOON et al., 2103; QUIMBY, 2019). As CTM constituem uma população heterogênea de tipos celulares e apresentam pequenas diferenças em sua morfologia, capacidade proliferativa e diferenciação dependendo de seu tecido de origem. Suas propriedades e funções também divergem dependendo da fonte, métodos de isolamento, cultura e manipulação. Por isso, para serem consideradas CTM, a International Society Cellular Therapy (ISCT) estabeleceu critérios de padronização, de forma que para serem consideradas CTM, estas células devem apresentar certas características como: aderência ao plástico em culturas celulares, expressão de marcadores de membrana como: CD73, CD105, CD 90, ausência de CD14, CD34, CD45, CD11b, CD79A, HLA-DR, capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (RASMUSSEN, 2006; HARMAN, 2013; TAEHOON et al, 2103, AGGARWAL & PITTENDER, 2015).

Há diversos meios de uso terapêutico de células-tronco, como o uso autólogo, que se refere à utilização de células-tronco próprias, do mesmo indivíduo. O uso autólogo é considerado de baixo risco e sem questões éticas. O uso alogênico ou heterólogo refere-se ao emprego de células-tronco em indivíduos da mesma espécie, porém não idênticos geneticamente, o que é possível devido ao fato das células-tronco não serem imunogênicas: não expressam moléculas de MHC classe II, apresentam baixa expressão de

moléculas de MHC de classe I, e ausência da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD40, características estas que conferem às CTM capacidade de imunoevasão, embora haja informações limitadas quanto a segurança de seu uso em longo prazo. Já o xenotransplante é o uso de células-tronco em diferentes espécies, os quais tem sido utilizados somente como ferramentas de pesquisa para estudo das CTM e seus mecanismos de ação *in vivo* ( RASMUSSEN, 2006; WEBSTER et al., 2010; SHIN, et al., 2013; CHOW et al.,2017).

Em medicina veterinária, o uso autólogo das CTM originárias de tecido adiposo iniciou-se em 2003 e desde então numerosos trabalhos têm sido conduzidos em equinos e caninos com mínimos efeitos sistêmicos e adversos. Inicialmente, os estudos focavam nos efeitos regenerativos das células-tronco, entretanto, a observação de seus efeitos imunossupressor, imunoregulatório e anti-inflamatório, ampliou seu estudo no tratamento de doenças crônicas inflamatórias e degenerativas (WEBSTER et al., 2010; HOFFMAN & DOW, 2016; GUGJOO et al., 2019).

O mecanismo pelo qual as células-tronco reparam e regeneram os tecidos afetados não é totalmente compreendido. Existem evidências que múltiplos mecanismos sejam envolvidos. Após a aplicação na corrente sanguínea, as células-tronco são encontradas primeiramente no pulmão, em seguida no baço e fígado, e em uma proporção insignificativamente menor incorporada nos tecidos afetados e na região de localização dos pericitos. Embora seu tempo de sobrevivência no organismo pareça ser curto, as interações das CTM com os distintos tipos celulares na corrente sanguínea parecem contribuir para sua atividade de imunomodulação e anti-inflamatória prolongada, com produção de fatores de crescimento e moléculas bioativas que com atividade parácrina local, alterando o microambiente em que se incorporam (LELBACHER & HENSCHLER, 2006). Na figura 1 está ilustrado alguns mecanismos de ação imunomodulação mediados pelas células-tronco quando na corrente sanguínea.

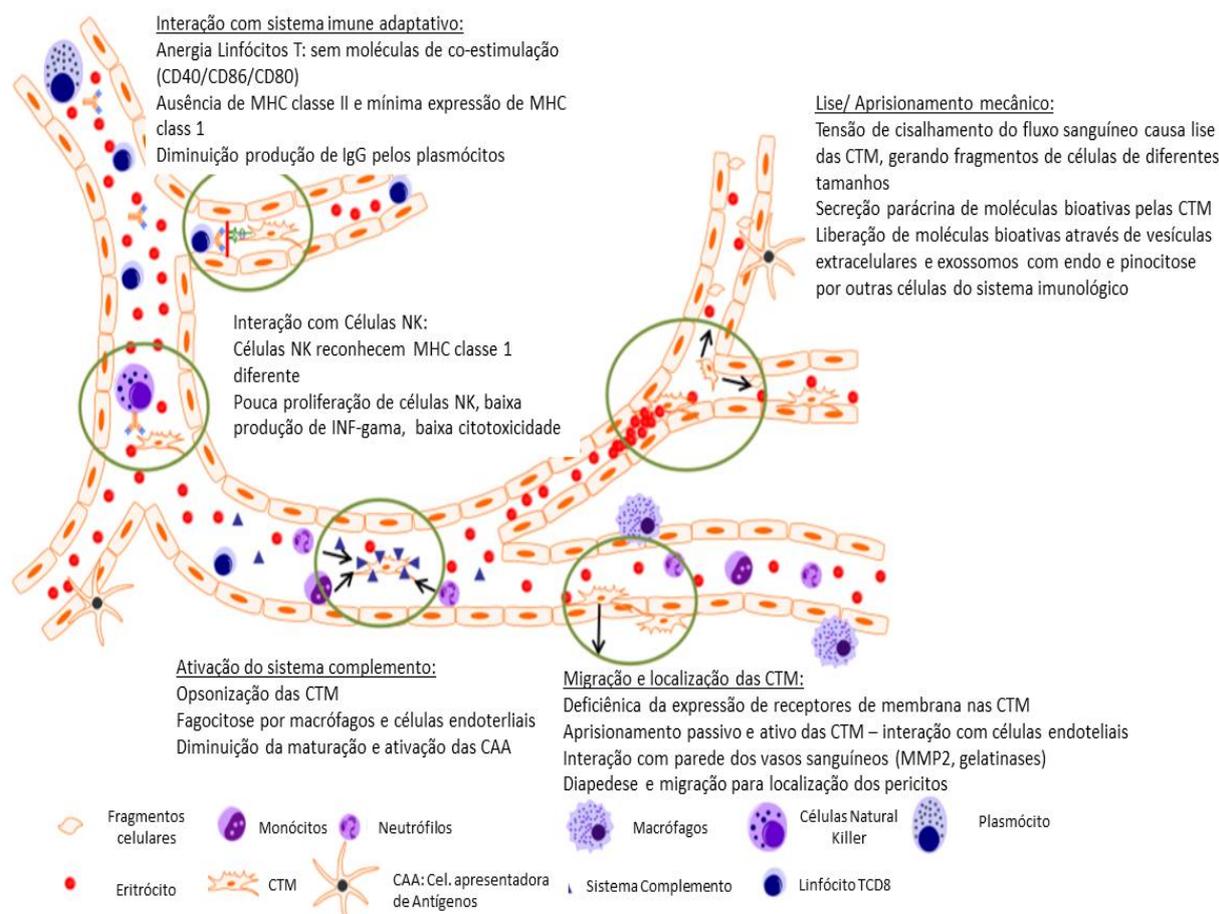
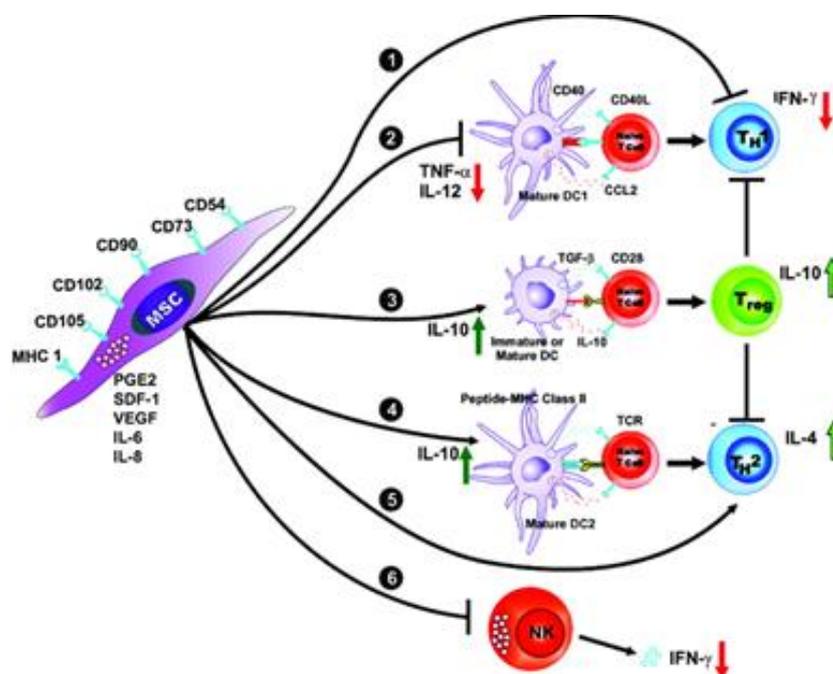


Figura 1: Mecanismo proposto de ação parácrina das células-tronco segundo Leibacher & Henschler (2016) adaptado: meios possíveis que as CTM interagem com o microambiente da corrente sanguínea. Os círculos na figura demonstram as possíveis interações entre as CTM e os distintos tipos celulares.

A ação das CTM está associada à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes, como: fator de necrose tumoral, interleucina 1a, 1b (SEMEDO et al., 2007). Além disso, produzem fatores de crescimento e citocinas com efeito anti-inflamatório como a Il10. Após sua introdução, as células-troncos incorporam-se aos tecidos permanecendo com sua ação parácrina por período prolongado, a qual possui propriedades angiogênicas, antiapoptóticas e anti-cicatrizantes (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; RASMUSSEN, 2006; DUFFY et al., 2011; HARMAN, 2013).

As CTM são capazes de interagir com o sistema imune inato e adaptativo, e atuam na supressão da proliferação, diferenciação e ativação de diversas células imunológicas, como linfócitos T, B, células dendríticas e natural killers

(SHIN et al., 2017). Possuem potente atividade inibitória na proliferação de linfócitos mediante antígenos e mitógenos. Apresentam características semelhantes a células T regulatórias CD4 e CD25, aumentando a secreção de citocinas anti-inflamatórias; atuam na diminuição da proliferação linfocitária, reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias de perfil TH1 como IFN-gama, IL12; diminuem a apresentação de antígenos, e suprimem a diferenciação e a maturação de células dendríticas, linfócitos e células natural killers. Todas estas ações são mediadas tanto pelo contato direto célula a célula como pela secreção parácrina de diversos mediadores imunoregulatórios (Figura 2) (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; RASMUSSEN, 2006; DUFFY et al., 2011; CHOW et al., 2017; SHIN et al., 2017).



Sudeepa Aggarwal, and Mark F. Pittenger Blood  
2005;105:1815-1822



©2005 by American Society of Hematology

Figura 2 – Mecanismo proposto de ação das células-tronco segundo Aggarwal & Pittenger (2005): As células-tronco exercem seus efeitos imunomoduladores pela interação com o sistema imune inato: células dendríticas (via 2,4), células naturais killers (via 6) e com o sistema imune adaptativo: linfócitos T ( via 1, 5). As Células-tronco inibem a secreção de TNF-alfa e promovem a secreção de IL10, afetando a maturação e a função das células dendríticas. Estas ações redirecionam a resposta imune para um fenótipo de tolerância/ anti-inflamatório. As células-tronco,

quando presentes em um microambiente inflamatório, inibem a secreção de INF-gama pelos linfócitos TH1 e pelas células natural killers e aumentam a secreção de IL4 pelas células TH2. É provável que as células-tronco também exerçam suas ações imunomodulatórias pelo contato direto célula-célula bem como pela secreção de fatores.

O contato célula-célula faz com que as CTM produzam diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócito, fator estimulador de crescimento de macrófagos e diversas interleucinas (IL1,IL6,IL7,IL8,IL11,IL12,IL14,IL15), que atuam nos fibroblastos e nas células granulocíticas, envolvidas no processo de inflamação (RASMUSSEN, 2006; LELBACHER & HENSCHLER, 2006; SHIN et al., 2017, WEBSTER et al., 2010; HARMAN, 2013)

Devidos suas propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e imunomodulatórias, pela sua capacidade de imunoevasão, segurança e efetividade, as CTM têm sido utilizados na clínica médica há mais de 10 anos no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes refratárias a tratamentos convencionais (Figura 3) (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; DUFFY et al., 2001; WEBSTER et al., 2013; SHIN et al., 2017).

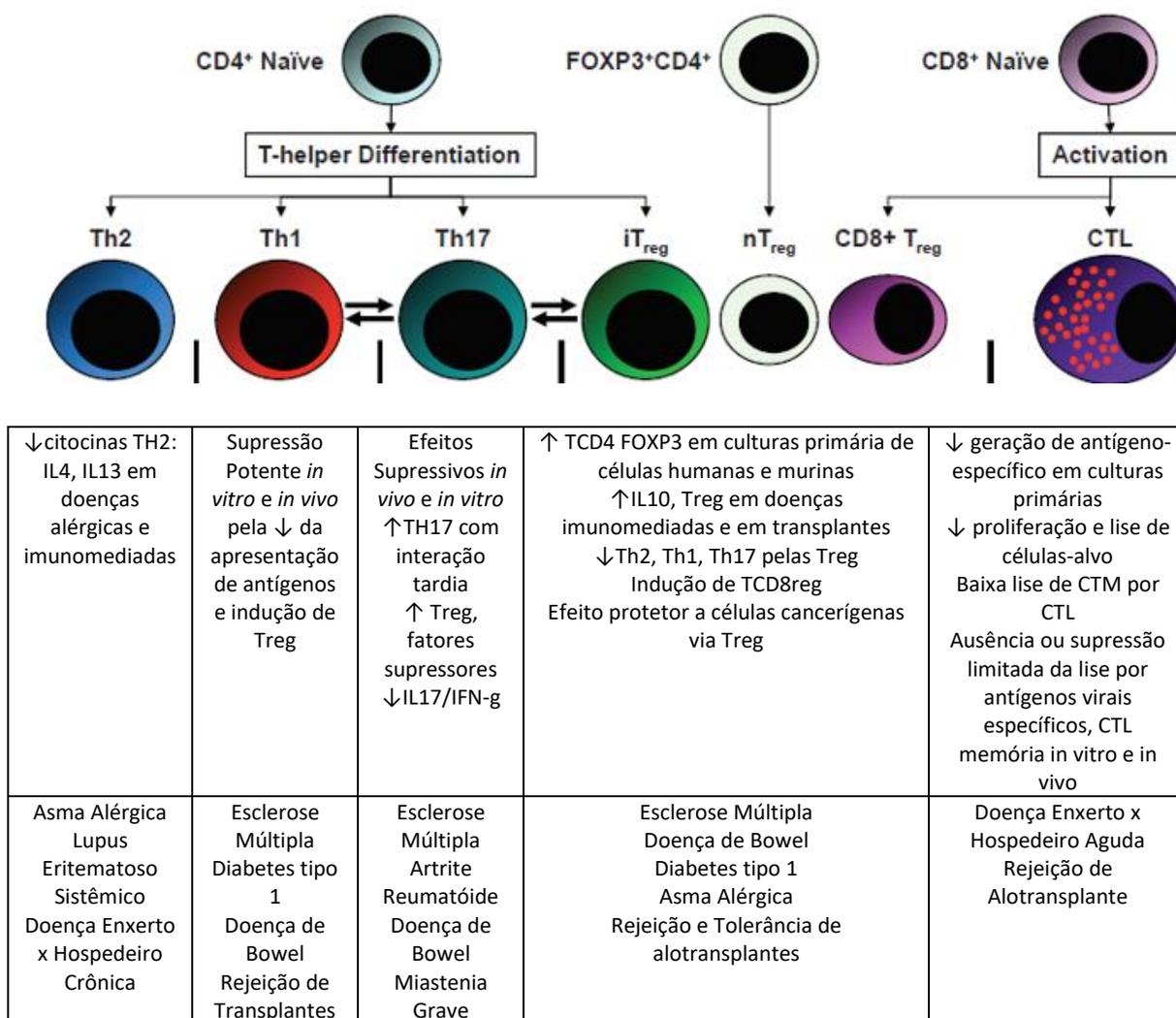


Figura 3 – Diagrama reportando os efeitos das células-tronco mesenquimais nos diferentes subtipos de linfócitos Th1, Th2, Th17, Treg em algumas doenças clínicas importantes associadas com estes fenótipos. Fonte: Duffy et al., 2011

#### 1.6.1. Células-tronco mesenquimais no tratamento da dermatite atópica canina

Primeiramente, na dermatologia humana, o emprego das CTM foi iniciado na reposição de defeitos cutâneos e cicatrização de feridas, entretanto, a partir de evidências das propriedades anti-inflamatórias das CTM, possivelmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias, seu uso passou a ser estendido no tratamento de diversas doenças autoimune e imunomediadas incluindo doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD), lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase e diabetes tipo I com resultados benéficos (KIM et al., 2017; SHIN et al., 2017).

Apesar do desenvolvimento de tratamentos inovadores, incluindo imunoterapia alvo-biológicas, como o Dupilumab, anticorpo monoclonal anti-interleucina 4, a dermatite atópica humana não pode ser curada completamente, portanto, diversos estudos têm sido realizados com o propósito de investigar os efeitos das CTM no alívio dos sintomas da dermatite atópica em modelos animais. Semelhante, ocorre em veterinária, onde tampouco o uso de anticorpos monoclonais anti-IL31 conseguem sanar as manifestações da dermatite atópica em todos os cães. Estudos mais recentes têm demonstrado que CTM são capazes de melhorar doenças alérgicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica (SHIN et al., 2017).

Em um estudo com modelo murino sensibilizados com *Dermatophagoides farinae*, a administração de CTM, derivadas do cordão umbilical, exerceu efeitos protetores terapêuticos, melhorando os sintomas de dermatite atópica pela diminuição da degranulação mastocitária. Neste estudo, a diminuição da concentração sérica de IgE diferiu conforme a via de administração das células-tronco. Injeções subcutâneas locais de CTM exibiram um potencial terapêutico notável em dermatite atópica de ratos comparados com administração endovenosa. As citocinas, PGE2 e TGFB1 secretadas pelas células-tronco de origem de cordão umbilical, foram associadas à supressão da degranulação mastocitária e da expressão do FCER1 (KIM et al., 2015).

Em um modelo de dermatite atópica murino, a administração de células-tronco derivadas do tecido adiposo, via endovenosa, diminuiu as alterações histológicas e as concentrações de IgE. A avaliação destas células em culturas demonstrou inibição significativa da proliferação e da maturação de linfócitos B via sinalização da cicloxigenase-2 (COX-2). Além disso, a degranulação mastocitária também foi suprimida, concluindo que as células-tronco derivadas de tecido adiposo são capazes de amenizar as manifestações da dermatite atópica pela regulação da atividade dos linfócitos B (SHIN et al., 2017).

Kim e colaboradores (2017) realizaram um estudo envolvendo 34 pacientes humanos com dermatite atópica que receberam uma única aplicação subcutânea, de células-tronco heterólogas oriundas de cordão umbilical em diferentes doses, e observaram efeito terapêutico dose-dependente das células

tronco. Pacientes humanos que receberam uma dose maior de células-tronco ( $5 \times 10^7$  versus  $2,5 \times 10^7$ ), apresentaram uma melhora de 50% no índice de gravidade e área de eczema, uma diminuição de 33% no escore de avaliação global do investigador e uma diminuição de 50% no escore de gravidade da dermatite atópica e redução do prurido em 58%, com o níveis de IgE e número de eosinófilos periféricos diminuindo durante o estudo.

Em medicina veterinária, estudos também tem demonstrado o efeito benéfico das células-tronco em diversas condições clínicas incluindo osteoartrite, injúrias em tendões, lesões musculares e esqueléticas, em afecções do sistema nervoso central e na pele (WEBSTER et al., 2012).

Até o momento em medicina veterinária, existe um diminuto número de estudos avaliando a ação das CTM na dermatite atópica. Um estudo clínico (piloto, aberto, não-controlado, não-cego) avaliou o efeito de uma única aplicação, de célula-tronco mesenquimais autólogas originária de tecido adiposo, na dose de 1,3 milhões de células por quilo de peso, via endovenosa em cinco cães atópicos. Neste estudo, foi observada diminuição significativa do escore de prurido e melhora não significativa do CADESI com duas a três semanas após a aplicação, seguido de piora progressiva até a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana, quando o prurido retornou ao estágio inicial. Não foram relatados efeitos colaterais em nenhum dos animais (HALL et al., 2010).

Jee e colaboradores, (2013), observaram melhora clínica dos sintomas de dermatite atópica em cães sensibilizados com *Dermatophagoides farinae*, após a aplicação tópica, por três dias consecutivos, de extrato de células-tronco mesenquimais. Nestes animais foi observado aumento da secreção de citocinas imunossupressoras como a IL10 e TGF-beta, diminuição da infiltração da epiderme por linfócitos TCD3 e TCD4 e inibição de citocinas pró inflamatórias, como: IL6, INFC, iNOS, eNOS e Nox4.

Ramos e colaboradores (2011), também relataram sucesso na terapia celular em um Golden Retriever, de dois anos de idade, que recebeu três aplicações endovenosas com intervalos de 21 dias entre as aplicações com células-tronco heterólogas derivadas de tecido adiposo, sendo referido controle dos sinais clínicos e diminuição do prurido por um período de seis meses após aplicação, período em que o animal foi acompanhado.

Recentemente, um estudo avaliando o uso de uma aplicação única, endovenosa, na dose de 1,5 milhões de células-tronco heterólogas derivadas de tecido adiposo por quilo de peso, em 26 animais com DA recalcitrante, observou melhora significativa do prurido em uma semana e do CADESI-4 em quatro semanas, efeito que se perpetuou após 6 meses da aplicação, não sendo relatados efeitos colaterais e alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos (VILLATORO et al., 2018).

### **1.7. Justificativa**

Diante das propriedades das células-tronco mesenquimais, o uso destas na terapia de doenças inflamatórias e imunomediadas, como a dermatite atópica é promissor, de forma que é vigente a necessidade de mais pesquisas com novos protocolos terapêuticos a fim de se avaliar a efetividade, segurança e aplicabilidade destas células como modalidade de tratamento em cães com dermatite atópica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a utilização das células-tronco mesenquimais na resposta clínica, nos lipídeos epidérmicos e na resposta inflamatória cutânea de cães com dermatite atópica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a resposta terapêutica com o uso das células-tronco mesenquimais no tratamento de cães com dermatite atópica, por meio da análise dos escores de prurido e do escore de lesão;
- Avaliar a segurança do uso da CTM para tratamento de cães com dermatite atópica;
- Avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais nos padrões de resposta inflamatória cutânea em cães com dermatite atópica, por meio da avaliação de citocinas do tipo CD4 TH1 (TNF-alfa), tipo CD4 TH2 (IL-31, IL-4, IL6) e linfócitos T CD4 regulatório (IL 10), pela técnica de imunistoquímica;
- Avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais na barreira epidérmica de cães com dermatite atópica através da análise da expressão da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica e dos lipídios epidérmicos pela coloração de Sudam Red.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Seleção dos animais**

O presente trabalho é um estudo longitudinal, duplo-cego, submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp campus Botucatu, sob protocolo número 131/2015. Todos os tutores foram devidamente esclarecidos sobre todos os aspectos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, autorizando a realização de todos os exames necessários.

Para a realização do trabalho foram incluídos no estudo nove animais diagnosticados com dermatite atópica no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da FMVZ campus Unesp Botucatu. Todos os animais eram hígidos quanto aos demais sistemas orgânicos, sem que houvesse distinção quanto à raça, idade e sexo. Para inclusão no estudo, os animais deveriam estar há cerca de 30 dias sem uso de quaisquer fármacos antipruriginosos. Não foi permitido o uso de nenhum outro tratamento tópico ou sistêmico durante a realização deste estudo, exceto pela manutenção dos ectoparasiticidas de forma regular e do uso de shampoo de clorexidina 3% quando necessário, os quais já estavam sendo utilizados previamente antes do início do estudo.

O diagnóstico de dermatite atópica foi estabelecido baseado nos dados da anamnese, no exame físico e dermatológico, na realização de exames complementares conforme necessário (escovado do pelame, tricograma, impressão em fita de acetato, citologia cutânea, exame parasitológico de raspado cutâneo, inspeção via fluorescência por lâmpada de Wood, cultura fúngica), e pela concordância com os critérios de diagnóstico para dermatite atópica estabelecidos por Favrot et al. (2010).

Após a exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e outros quadros alérgicos como dermatite alérgica a picada de pulgas e hipersensibilidade alimentar, os animais foram avaliados quanto à concordância com os critérios de diagnóstico estabelecidos por Favrot 2010 (Quadro 1). Foram incluídos no projeto, somente cães que obedeceram pelo menos seis desses oito critérios.

Quadro 1: Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico de dermatite atópica canina

Início das manifestações clínicas antes de três anos de idade
Cães intradomiciliares
Prurido responsivo a corticosteroides
Prurido primário (prurido alésional)
Patas torácicas afetadas
Pavilhões auriculares afetados
Margens de orelhas livres de lesões
Região lombosacra livre de lesões
<i>O preenchimento de cinco dos critérios acima determina sensibilidade de 85% e especificidade de 79%, enquanto que, seis critérios determinam especificidade de 89% e sensibilidade de 58% no diagnóstico clínico da dermatite atópica.</i>

Fonte: Favrot (2010).

### 3.2. Delineamento Experimental

Os cães com dermatite atópica incluídos no estudo foram submetidos a dois tipos de tratamento em momentos distintos. Durante estes tratamentos, os animais foram avaliados quanto à segurança, à efetividade em relação aos aspectos clínicos e quanto à resposta inflamatória e barreira cutânea.

Primeiramente, os animais foram submetidos ao tratamento placebo, constituído por três aplicações de dois mililitros de soro fisiológico 0,9%, via endovenosa, em intervalos quinzenais, realizadas nos dias 0, 15 e 30 do estudo. Em seguida, estes mesmos animais receberam três aplicações de CTM, por via endovenosa, na dose de  $5 \times 10^6$  células por animal, em intervalos quinzenais, aplicadas nos dias 45, 60 e 75 do estudo.

Durante o estudo, para a avaliação da segurança e da efetividade da terapia com CTM, os animais foram avaliados quinzenalmente por meio de exames laboratoriais (hemograma, análise bioquímica e urinálise) e exame físico e dermatológico, com quantificação das lesões tegumentares através do escore de lesões CADESI-4 e pelo emprego da escala visual de prurido esclarecido (EVPE).

Para análise da resposta inflamatória da pele e análise dos lipídios epidérmicos, foram coletados fragmentos cutâneos por meio de biópsia nos dias 0, 45, e 90, correspondendo respectivamente: ao primeiro tratamento placebo, final do tratamento placebo/início do tratamento com CTM e final do tratamento com CTM. A resposta inflamatória cutânea foi avaliada pelo padrão de expressão das citocinas do tipo TH1 (TNF- alfa), TH2( IL31, IL4, IL6) e T reg (IL 10) pela técnica de imunistoquímica . A barreira cutânea foi avaliada através da expressão da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica e pelos lipídios epidérmicos através de coloração específica Sudam Red. O delineamento experimental encontra-se resumido na Figura 4.

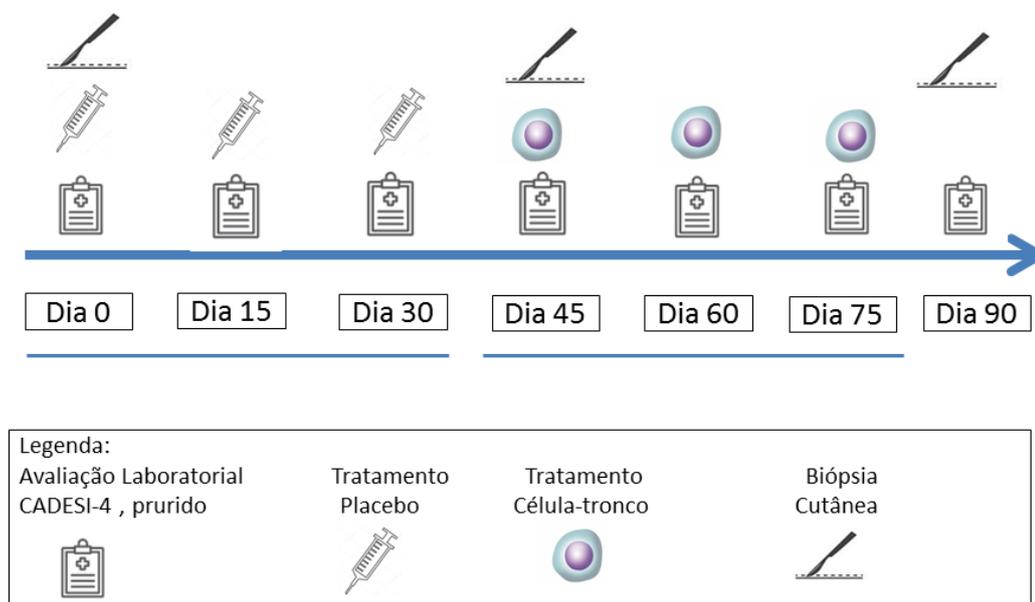


Figura 4: Delineamento Experimental

### 3.3. Aplicação das células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais foram fornecidas pelo laboratório REGENERA® (Campinas, Brasil), empresa devidamente registrada no Conselho de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo sob CRMV-SP 33715-PJ, registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) N° SP000330-1/ (Good manufacturing practices – GMP). As células-tronco mesenquimais utilizadas no estudo, eram derivadas de tecido adiposo periovariano, obtidas de cadelas híginas de até dois anos de idade submetidas à cirurgias eletivas de ovário-salpingo-histerectomia, realizadas em clínicas veterinárias devidamente treinadas e credenciadas pela empresa, sendo portanto consideradas células-tronco mesenquimais heterólogas. Para a coleta do tecido adiposo ovariano, as cadelas eram avaliadas clinicamente e submetidas a testes de sanidades através de exames hematológicos pelo hemograma, perfil bioquímico e exclusão de leishmaniose, cinomose, parvovirose através de testes sorológicos previamente a coleta.

Após a coleta, os fragmentos de gordura foram transportados em caixa térmica, sob temperatura controlada, em meio de transporte composto por glicose alta média modificada por Eagle da Dulbecco (DMEM-H) e estreptomicina 500 U/ml e penicilina 500U/ml (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EUA) e processadas dentro de duas horas. As células adiposas eram isoladas usando um protocolo padrão baseado na fragmentação seguida pela digestão com colagenase IV. As células isoladas foram plaqueadas a  $1 \times 10^5$  em placas de 36 mm (TPP, Trasadingen, Suíça) com DMEM-H suplementado com soro fetal bovino HyClone a 15% (No. de catálogo SH30070-03; Logan, UT, EUA), 100 U/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina, 2 mM de L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais (Thermo Fisher Scientific), constituindo meio de cultura basal. As culturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 a 7 dias, as células eram lavadas duplamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS; Gibco, Gaithersburg, MD, EUA), dissociadas com tripsina a 0,25% (Thermo Fisher Scientific) e expandidas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (TPP).

As CTM foram caracterizadas de acordo com os critérios preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) como o Guia de Boas Práticas de Fabrico em produtos de Terapia Avançada aprovado pelo Comité de las Américas de Medicamentos Veterinários – CAMEVET (setembro/2019), sendo avaliadas quanto a expressão positiva dos marcadores CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, NG2, Vimentina, Nestina, SOX2, SOX9, SOX17 e negativa para os marcadores CD45, CD34, CD144, CD11b, pelas técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo, além de serem testadas quanto a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in*

*vitro*. As células-tronco mesenquimais também foram rastreadas quanto à presença de patógenos e contaminantes (por exemplo, bactérias, fungos, vírus, micoplasma e endotoxinas). Após a caracterização, as células foram criopreservadas a  $2 \times 10^6$  células /ml em meio criogênico de dimetilsulfóxido a 10% (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), soro bovino fetal a 40% e DMEM-H e mantidas a  $-80\text{C}^\circ$  até o momento de sua utilização.

Além das células-tronco, a empresa forneceu todo o material (estéril e apirogênico) para seu preparo, que compreendeu: um criotubo contendo as células-tronco, um tubo de propileno com solução de descongelamento e dois tubos de propileno contendo solução de lavagem, e pipetas Pasteur descartáveis.

Primeiramente as CTM foram descongeladas por 2 minutos em banho-maria a  $37\text{C}^\circ$ ; e imediatamente transferidas para a solução de descongelamento e centrifugadas por 5 minutos a baixa velocidade (1100 rpm; força centrífuga relativa (RCF) = 216 g) (Centrífuga Fanem, Modelo 206BL). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, a solução de lavagem 1 foi adicionada e as células foram homogeneizadas suavemente até o precipitado se dissolver e centrifugadas a  $216 \times g$  e 1100 RPM por 5 minutos. Este processo foi repetido com a solução de lavagem dois. Após o término do processo de lavagem, o pellet resultante foi ressuspendido com dois ml de solução fisiológica para aplicação. Após o preparo, as células foram aplicadas imediatamente nos cães previamente cateterizados, por via endovenosa periférica na veia cefálica . A aplicação da CTM, na dose de  $5 \times 10^6$  células/animal, foi realizada lentamente através de uma seringa de três ml acopladas a agulha 40x12cm para evitar danos celulares. Todo o processo de preparo e aplicação das células-tronco foi realizado pelo

médico veterinário responsável pelo acompanhamento dos animais do estudo previamente treinado pela empresa.

### **3.4. Avaliação Laboratorial**

Para a análise de segurança da terapia com células-tronco mesenquimais, os animais foram submetidos a coleta de sangue em todos os momentos de estudo conforme ilustrado previamente no Quadro 2. Todos os exames foram realizados no Serviço de Patologia Clínica da FMVZ, Unesp Botucatu. Para execução dos exames, foram coletados 3ml de sangue de sangue periférico por venopunção da veia cefálica, e acondicionado em tubos com EDTA para avaliação hematológica (hemograma e contagem de plaquetas), e em tubos secos para realização da bioquímica sérica compreendendo a análise das concentrações de: ureia, creatinina, fosfatase alcalina (FA), alanina transaminase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), proteína total, albumina e globulina. O exame de urina, coletado por cistocentese, com prendeu a avaliação macroscópica, exame físico-químico e análise do sedimento urinário conforme técnica empregada rotineiramente no Serviço de Patologia Clínica.

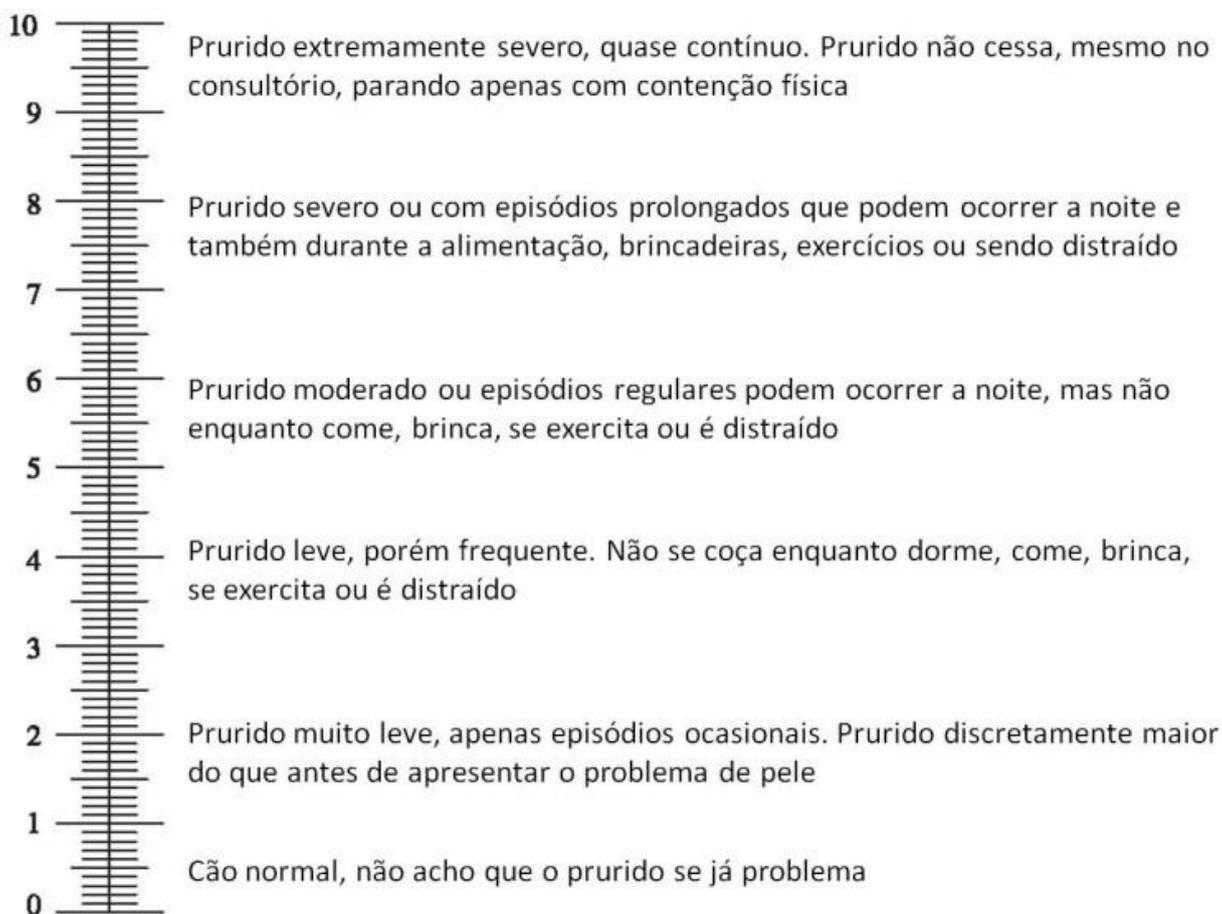
### **3.5. Avaliação Dermatológica**

Para avaliação da efetividade das CTM no tratamento de cães atópicos, os animais foram avaliados quanto ao quadro clínico dermatológico, através da verificação da intensidade do prurido e da presença de lesões tegumentares durante todos os momentos do estudo.

#### **3.5.1. Avaliação do prurido**

A avaliação do prurido foi feita primeiramente através da solicitação aos tutores que atribuíssem uma nota verbal para o prurido apresentado por seus animais em uma escala de 0-10 (prurido espontâneo). Posteriormente, foi solicitado aos tutores que identificassem uma nota para o prurido de seus animais conforme o escore visual de prurido esclarecido (EVPE) proposto por Rybníček et al. (2008), conforme ilustrado na figura 5 abaixo:

Figura 5: Escala Visual de Prurido Esclarecido (EVPE).



Fonte: Rybníček et al., (2008)

### 3.5.2. Avaliação do escore corporal de lesões tegumentares

Para evitar subjetividade na avaliação das lesões tegumentares, foi utilizada a tabela de escore de lesões denominada CADESI-4 (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) elaborada e validada por Olivry et al. (2014). A adoção desta escala foi baseada na sua simplicidade em comparação com sua versão anterior, otimizando seu uso na rotina clínica. Nesta tabela, as lesões características, tipicamente encontradas em cães com dermatite atópica, são registradas em cada um das 20 regiões topográficas habitualmente comprometidas. Nesta escala, as lesões características da dermatite atópica como o eritema, a alopecia/escoriação e a lignificação, são pontuadas de 0 a 3 em cada região corpórea pré-determinada, sendo a pontuação zero referente a ausência de lesões; nota 1, lesões consideradas leves; nota 2, lesões moderadas; e nota 3, lesões graves. A somatória da pontuação registrada é

então utilizada para graduar a gravidade das manifestações clínicas. O escore CADESI-4, semelhantemente a suas versões anteriores foi validada, apresentando confiabilidade e sensibilidade satisfatórias (OLIVRY et al., 2014). A escala CADESI utilizada neste estudo encontra-se ilustrada no quadro a seguir (Quadro 2):

Quadro 2. Escore de avaliação de lesões tegumentares (CADESI-4) em cães com diagnóstico de dermatite atópica

CADESI -04 (ICADA)		Eritema	Lignificação	Escoriação e/ou Alopecia	TOTAL
Região Perilabial bilateral		1			
Pavilhão Auricular	E	2			
	D	3			
Axila	E	4			
	D	5			
Membros Torácicos (face dorsal e palmar)	E	6			
	D	7			
Membros Pélvicos (face dorsal e plantar)	E	8			
	D	9			
Flexura do Cotovelo	E	10			
	D	11			
Metacarpo Palmar (do carpo até os coxins)	E	12			
	D	13			
Flancos	E	14			
	D	15			
Região Inguinal	E	16			
	D	17			
Abdômen		18			
Períneo		19			
Cauda Ventral		20			
<p>Escore lesional: 0: ausente 1: leve 2: Moderado 3: grave            Interpretação Escala CADESI-4 (Total de pontos: 20X3X3=180): Cães Normais: &lt; 10;            DA em remissão: &lt; 10; DA leve: 10-34; DA moderada: 35-59; DA grave: 60 pontos.</p>					

Fonte: OLIVRY et al., 2014

### 3.6. Colheita dos fragmentos cutâneos

Para a realização das biópsias de pele, pela sua mínima invasividade, os animais foram contidos fisicamente e submetidos a anestésico local com lidocaína 2% sem vasoconstritor (Lidovet<sup>®</sup>, Bravet, Brasil), sendo em seguida, biopsiados por meio de sacabocado de 6mm na região cervical dorsal de acordo com Barbosa (2015).

Para a realização das análises de imunoistoquímica foram coletados três fragmentos cutâneos em momentos distintos, sendo estes coletados no início do estudo (dia 0); ao término do tratamento placebo/início do tratamento com CTM (dia 45), e finalmente, ao término do tratamento com células tronco mesenquimais (dia 90).

Para preservação dos fragmentos cutâneos, após identificados, foram acondicionados em criotubos embebidos em crioprotetor OCT Tissue Teck<sup>®</sup>, e congelados no freezer à - 80°C. Os cortes histológicos foram realizados em aparelho de criostato modelo LEICA CM 1850 (Buffalo Grove, EUA), obtendo cortes de 5µm em lâminas silinizadas, e após preparadas mantidas em *freezer* a - 20°C até o momento da realização da técnica de imunoistoquímica.

### 3.7. Técnica de Imunoistoquímica

Para a realização da técnica de imunoistoquímica foi utilizado o protocolo estabelecido pelo Serviço de Patologia Veterinária baseado na metodologia descrita por HSU et al., (1981). As lâminas com os tecidos foram retiradas do freezer -20C e mantidas em temperatura ambiente 27°C por 15 minutos para seu descongelamento. Para início da técnica de imunoistoquímica, as amostras de tecidos foram circundadas com caneta hidrofóbica. Primeiramente, foi realizado o bloqueio de peroxidases endógenas pela adição de uma gota peroxidase por tecido e as lâminas mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi realizada tripla lavagem com água deionizada e secagem das lâminas. Posteriormente, foi instilado duas gotas em cada amostra de bloqueador de proteínas inespecíficas e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Após a remoção do bloqueio de proteína, sem realização de lavagem, foi instilado o anticorpo primário. As especificações e respectivas

diluições dos anticorpos primários utilizados no estudo estão descritas no quadro 3. As amostras com os anticorpos primários foram armazenadas em refrigerador a 4-8°C por um período de 18h. Após este período, as amostras foram lavadas com água deionizada e em seguida adicionado o anticorpo secundário Envision (Dako Bytomation, California, EUA) e mantidas em estufa a 27°C por uma hora. Seguidamente, as amostras foram lavadas com água deionizada e instilado o cromógeno diaminobenzidina - DAB (Dako Cytomation, California, EUA) durante 1 minuto, sendo imediatamente lavadas com água deionizada para cessar a reação. Finalmente, as lâminas foram submetidas a coloração de hematoxilina segundo os passos descritos a seguir. Primeiramente, foi adicionada hematoxilina à amostra por 2 minutos, com lavagem com água corrente por 5 minutos. As montagens das lâminas foram realizadas em 8 etapas sucessivamente, com duração de três minutos cada uma: fixação em álcool 85C, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, xilol I, xilol II, xilol III e, finalmente, coradas com hematoxilina para contra coloração. Após a retirada do excesso de material, as lamínulas foram coladas e as lâminas para análise por fim finalizadas.

Quadro 3: Anticorpos primários utilizados para a técnica de imunoistoquímica e suas respectivas especificações e diluições

<b>Tipo do Anticorpo primário</b>	<b>Especificações dos Anticorpos Primários</b>	<b>Diluição dos Anticorpos</b>
Filagrina	Rabbit polyclonal to Filaggrin (Bioss – Cód. Bs-6327-R)	1:25
IL31	Rabbit polyclonal to IL-31 (ABCAM - Cód. ab102750)	1:100
IL4	Anti-IL4, ac poli de coelho fr 100µg (ABCAM – Cód. AB9622)	1:600
IL6	Anti –IL6, ac pol fr 100 µg (Cloude clone – Cod PAA079Ca1)	1:300
IL10	Anti´IL10, ac pol fr 100 µg (Cloude clone – CodPAA056Ca01)	1:400
TNF alfa	Anti-TNF alpha, ac poli de coelho fr 200µg (ABCAM – Cód. AB6671)	1:600

A quantificação da expressão das citocinas e da filagrina pela técnica de imunistoquímica com a respectiva quantificação do infiltrado inflamatório presente em cada corte foi realizada pelo método semi-quantitativo de escore de distribuição de células marcadas, através de análise duplo-cega de dois avaliadores. Foi avaliada a proporção entre a quantidade de células positivas e células totais em todo o corte. O sistema de escore seguiu o descrito por Barbosa (2015), a saber: escore 0: ausência de marcação nas células; 1: 1 a 25% de células positivas; 2: 26 a 50% de célula marcada, 3: 51-75% de células marcadas ; e 4 > 76% das células marcadas.

### **3.8. Coloração dos Lipídeos Epidérmicos**

Para a coloração dos lipídeos epidérmicos foi utilizada a coloração de Sudam Red conforme estabelecido por Salvador (2014). Os cortes após descongelamento foram lavados em álcool 70°C. Em seguida, foram corados pela coloração de Sudam III - Escarlata R por 45 minutos e lavados novamente em álcool 70°C e em água por três a quatro minutos. Posteriormente, foram corados por hematoxilina de Harris por três minutos e lavados em água por cinco minutos. Em seguida, as amostras permaneceram no diferenciador em álcool ácido por 5 a 10 minutos, lavadas em água por 5 minutos e, finalmente, realizada a montagem em meio aquoso (Aquatex<sup>®</sup>, Merck, Germany).

Os lipídeos epidérmicos foram avaliados semi-quantitativamente e classificados em uma escala variando de ausência (0), leve (1), moderado (2) intenso (3) (SALVADOR, 2014).

### **3.9. Análise Estatística**

A distribuição de todas as variáveis foi avaliada com análises gráficas (QQ Plot e Histograma) e testes de normalidade (Shapiro-Wilk). O teste de Friedman seguido por Dunns foi utilizado para confrontar as medianas do escore de prurido esclarecido (EVPE) e escore de lesões CADESI-4 obtidas em todos os momentos de avaliação do estudo. A análise dos escores das citocinas, da filagrina e dos lipídeos entre o início do estudo (Dia 0), final do efeito do tratamento placebo e início do tratamento com células-tronco (Dia 45) e final do tratamento com células-tronco (dia 90) foi realizada através do teste de Fisher.

O teste de Spearman foi utilizado para verificar a existência de correlação entre os escores das citocinas, da filagrina e dos lipídeos entre si. Este mesmo teste foi utilizado para correlacionar os escores obtidos das citocinas e da filagrina com o grau de infiltrado inflamatório em seus respectivos cortes. Foi calculada porcentagem de redução dos escores de prurido esclarecido e lesões tegumentares CADESI-4 entre o início e final do tratamento com células-tronco e o Teste T foi utilizado para verificar se a média de tais porcentagens diferiu do valor hipotético de 50%, visto que a redução de mais de 50% dos EVPE e do CADESI-4 são critérios utilizados para avaliar eficácia do tratamento em cães com dermatite atópica (COSGROVE et. al., 2013; SOUZA et al., 2018). Foi utilizado o nível alfa de 0,05 para todas as análises estatísticas. Os testes foram realizados com auxílio do Statistical Analysis Software – SAS versão 9.3 (SAS Institute, 2011) e o software Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, 2007).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização dos animais do estudo

Inicialmente, foi selecionada a participação de nove animais, porém, no decorrer do desenvolvimento do trabalho, três deles foram excluídos do estudo por diferentes motivos, quer seja pela desistência de seus respectivos tutores (animais 2 e 3) ou pela inaceitabilidade dos efeitos colaterais (animal 1). A relação dos animais que foram excluídos encontra-se relacionada no quadro abaixo (Quadro 4):

Quadro 4 – Caracterização dos animais com dermatite atópica excluídos do estudo.

<b>Identificação</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Tempo de Evolução da Doença (meses)</b>	<b>Motivo de Exclusão</b>
1	maltês	fêmea	30	13	Efeitos colaterais
2	pug	fêmea	36	12	Desistência
3	golden retriever	macho	36	11	Desistência

Ao final, seis animais preencheram todos os critérios e finalizaram o estudo. No Quadro 5, estão dispostos os dados de resenha dos animais incluídos no estudo.

Quadro 5 – Caracterização dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo.

Identificação	Raça	Sexo	Idade (meses)	Tempo de evolução da Doença (meses)
1	pastor alemão	macho	84	24
2	poodle	fêmea	149	36
3	srd	fêmea	16	12
4	Labrador retriever	macho	60	28
5	pug	fêmea	24	12
6	lhasa apso	macho	26	13

Em relação à caracterização amostral, todos os animais, com exceção de um animal, todos apresentavam raça definida, sendo representados por cinco padrões raciais distintos, a maior parte das raças já relatadas como predispostas ao desenvolvimento de dermatite atópica. Não foi visualizada distinção sexual entre os animais. Quanto à idade, a maior parte dos animais eram adultos jovens e apenas dois senis (20%) e todos cursavam com a doença de forma crônica há mais de 12 meses.

#### **4.2. Avaliação da segurança do tratamento das células-tronco mesenquimais**

A aplicação das células-tronco mesenquimais demonstrou ser de fácil execução com o material fornecido pela empresa. Dos animais do estudo, dois apresentaram efeitos colaterais. Um animal apresentou quadro de hipotensão temporária aguda na primeira aplicação, sendo mantido em fluidoterapia e não necessitando de nenhuma intervenção terapêutica adicional para retorno à normalidade e foi excluído do estudo a pedido do seu responsável. A caracterização deste animal excluído do estudo encontra-se disposta no Quadro 4.

Um segundo cão, apresentou apatia na primeira e na segunda aplicação da CTM, sendo que na terceira aplicação apresentou efeitos mais pronunciados, como: salivação, desequilíbrio, letargia e trismo, efeitos estes temporários que também não requeriram intervenção medicamentosa. Mediante à ocorrência destes efeitos colaterais, os animais passaram a ser mantidos em observação por uma hora após a aplicação das CTM antes de serem alta hospitalar. Os demais animais não apresentaram nenhum efeito colateral durante as aplicações de células-tronco mesenquimais.

Os exames laboratoriais como hemograma, bioquímica e exame de urina não apresentaram alterações significativas entre os momentos distintos do estudo, não sendo atribuída às CTM nenhuma alteração digna de notas destes parâmetros. Não houve diferença estatística entre o Dia 0 ( $p > 0,05$ ) e Dia 90 ( $p > 0,05$ ) dos exames realizados. Os valores médios dos analitos dos exames laboratoriais são descritos no quadro a seguir (Quadro 6):

Quadro 6: Exames laboratoriais no início do estudo (Dia 0) e ao término do tratamento com células-tronco mesenquimais (Dia 90) dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo.

EXAMES		DIA 0	DIA 90
	Hemácia	6,03 ( $\pm 1,44$ )	6,33( $\pm 1,53$ )
	Hemoglobina	13,95 ( $\pm 2,75$ )	13,93 ( $\pm 1,75$ )
	Hematócrito	41,83 ( $\pm 9,54$ )	39,67 ( $\pm 6,65$ )
	VCM	68,68 ( $\pm 5,03$ )	63,75 ( $\pm 6,92$ )
	CHCM	34,42 ( $\pm 0,74$ )	35,33 ( $\pm 2,08$ )
<b>Hemograma</b>	Proteína Total	8,17 ( $\pm 0,92$ )	8,30 ( $\pm 1,22$ )
	RDW	11,78 ( $\pm 1,02$ )	12,40 ( $\pm 1,71$ )
	Plaquetas	316.333,3 ( $\pm 195534,8$ )	232.920,8 ( $\pm 167763,5$ )
	Leucócitos	14.233,3 ( $\pm 3177,2$ )	14.901,7 ( $\pm 5735,1$ )

<b>Bioquímico</b>	Ureia	41,1 ( $\pm$ 13,1)	55,3 ( $\pm$ 2,0)
	Creatinina	0,81 ( $\pm$ 0,14)	1,00 ( $\pm$ 0,30)
	ALT	37,5 ( $\pm$ 40,0)	35,0 ( $\pm$ 65,0)
	FA	43,0 ( $\pm$ 22,0)	46,0 ( $\pm$ 18,7)
	GGT	0,80 ( $\pm$ 1,5)	1,50 ( $\pm$ 3,00)
	Proteína total	7,10 ( $\pm$ 1,18)	7,25 ( $\pm$ 0,82)
	Albumina	2,93 ( $\pm$ 0,51)	2,87 ( $\pm$ 0,52)
	Globulina	4,17 ( $\pm$ 1,66)	4,38 ( $\pm$ 0,81)
<b>Urinálise</b>	Densidade	1,030 ( $\pm$ 0,02)	1,040 (0,02)
	Ph	6,33 (1,21)	6,42 (1,28)
	Proteína	0,1 ( $\pm$ 0,30)	0,0 (0,0;0,30)
	Bilirrubina	0,0	1,5 (0,8;7,0)

#### 4.3. Avaliação clínica e dermatológica

A efetividade do tratamento das células-tronco em relação aos aspectos clínicos foi avaliada através da escala visual de prurido esclarecido (EVPE) e da escala de escore de lesões tegumentares CADESI-4. Ao longo do tratamento placebo foi possível visualizar uma tendência a aumento do EVPE em todos os animais, seguido de sua diminuição progressiva do início do tratamento com CTM (Dia 45) ao seu término (Dia 90) conforme ilustrado na Figura 6.

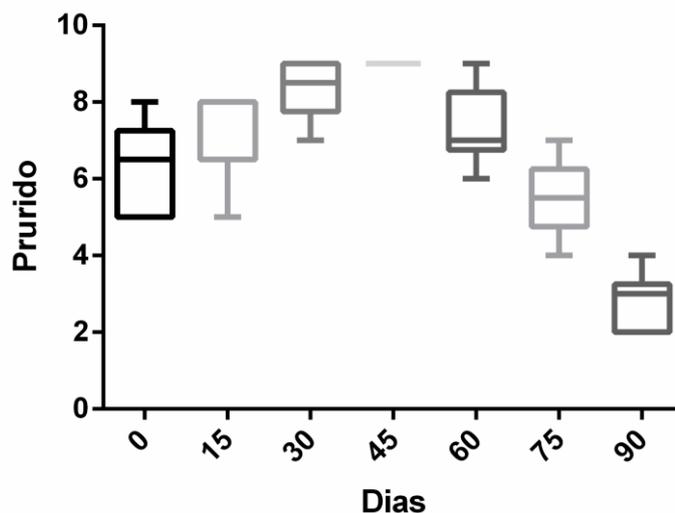


FIGURA 6: Escala visual de prurido esclarecido (EVPE) individual dos animais com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.

Semelhantemente, foi possível observar uma tendência a aumento do escore CADESI-4, na maior parte dos animais do estudo durante o tratamento placebo, seguido da diminuição destes escores após o início do tratamento com as CTM, conforme ilustrado na Figura 7.

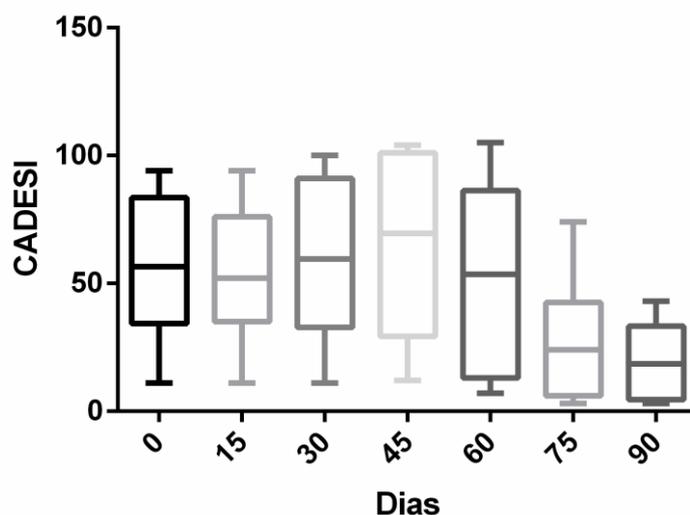


FIGURA 7: Escore individual de lesões tegumentares (CADESI-4) dos animais com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.

Foram observadas diferenças significativas entre mediana do EVPE e do escore CADESI-4 entre o início do tratamento com CTM (Dia 45) quando comparado ao término deste tratamento (Dia 90) conforme Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 – Mediana (Mínimo – Máximo) da escore visual de prurido esclarecido (EVPE) do escore de lesões tegumentares CADESI-4 dos cães com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo:

Dia	PLACEBO			CTM			
	0	15	30	45	60	75	90
<b>Prurido</b>	6,5 (5-8) <sup>abc</sup>	8 (5-8) <sup>abc</sup>	8,5 (7-9) <sup>ab</sup>	9 (9-9) <sup>a</sup>	7 (6-9) <sup>abc</sup>	5,5 (4-7) <sup>bc</sup>	3 (2-4) <sup>c</sup>
<b>CADESI</b>	56,5 (11-94) <sup>AB</sup>	52 (11-94) <sup>AB</sup>	59,5 (11-100) <sup>A</sup>	69,5 (12-104) <sup>A</sup>	53,5 (7-105) <sup>AB</sup>	24 (3-74) <sup>AB</sup>	18,5 (3-43) <sup>B</sup>

Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os dias para a escala de Prurido. Letras maiúsculas (A, B) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os dias para a escala CADESI.

A figura 8 ilustra de forma simultânea a redução das medianas dos escores da EVPE e do CADESI-4 de todos os animais com dermatite atópica em todos os momentos de observação do estudo.

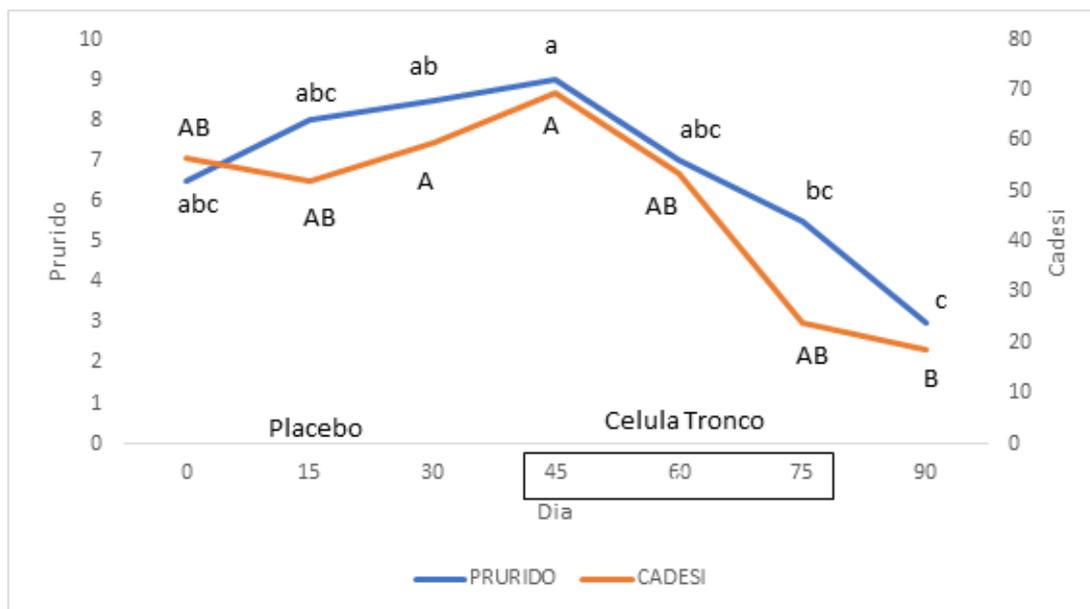


Figura 8: Medianas dos escores da escala visual de prurido esclarecido (EVPE) das lesões tegumentares (CADESI-4), dos animais com dermatite atópica ao longo de todos os momentos de observação do estudo

*Letras minúsculas (a, b, c) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os dias para a escore de Prurido*

*Letras maiúsculas (A, B) indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os dias para o escore CADESI-4*

A percentagem de redução do prurido entre o final do tratamento placebo (Dia 45) e final do tratamento com CTM (Dia 90) foi maior que 50% ( $p = 0,0029$ ), com a EVPE reduzindo em média de 9 (prurido extremamente grave) para 2,83 (prurido muito leve), com redução do prurido variando de 55,6 a 77,8% dentre os animais do estudo.

O escore de lesões CADESI-4 também apresentou redução média significativa de maior de 50% entre o final do tratamento placebo e final do tratamento com CTM ( $p = 0,0022$ ), com o escore diminuindo de 65 (dermatite atópica grave) para 19,66 (dermatite atópica leve, com redução média entre os animais variando de 58,7% a 85,7%). Somente dois animais reduziram o escore para pontuação menor que 10, considerada como remissão da doença (Tabela 2). As figuras 9 e 10 demonstram a evolução clínica de dois cães participantes do estudo entre o início do tratamento placebo (Dia 0) e término do tratamento com células-tronco (Dia 90).

Tabela 2: Porcentagem de redução do escore visual de prurido esclarecido (EVPE) e das lesões tegumentares (CADESI-4) dos animais com dermatite atópica ao final do tratamento placebo (Dia 45) e ao final do tratamento com células-tronco mesenquimais (Dia 90).

Animal	EVPE			CADESI-4		
	Dia 45	Dia 90	Redução (%)	Dia 45	Dia 90	Redução (%)
1	9	4	55,6	104	43	58,7
2	9	3	66,7	100	22	78
3	9	3	66,7	35	5	85,7
4	9	2	77,8	47	15	68,1
5	9	3	66,7	12	3	75
6	9	2	77,8	92	30	67,4
<b>Média</b>	9	2,83	68,5	65	19,6	72,1

A porcentagem média de redução para as escalas de prurido e CADESI foram estatisticamente maiores do que 50% em ambos os casos, com valores  $p = 0,0029$  e  $0,0022$  respectivamente.



**FIGURA 9. Animal 2:** No momento inicial do estudo, Dia 0 (fotos A e C), observamos alopecia, eritema, hiperpigmentação, hiperqueratose e lignificação em região pélvica de membros pélvicos (A) e eritema, hipotricose e hiperqueratose em região periorcular (C). No momento final do experimento, Dia 90, (fotos B e D) observa-se melhora das alterações cutâneas nas mesmas regiões citadas acima.



**FIGURA 10. Animal 3:** No momento inicial Dia 0, observamos eritema, escoriação, alopecia e hiperqueratose em região periorcular (A) e hipotricose, eritema e em região ventral e membros pélvicos (C). No momento final do experimento, Dia 90 (fotos B e D) observa-se melhora das alterações cutâneas nas mesmas regiões citadas acima

#### 4.4. Avaliação da resposta inflamatória cutânea e dos lipídeos epidérmicos

O padrão de expressão das citocinas inflamatórias do tipo TH2 (IL4, IL6, IL31) do tipo TH1 (TNF-alfa), Treg (IL10), da proteína filagrina e dos lipídeos epidérmicos, não apresentou diferenças significativas entre os distintos momentos de avaliação: Dia 0, Dia 45, Dia 90. Também não foi possível observar correlações significativas entre os padrões de expressão destes marcadores entre si. Na Tabela 3 estão resumidos os resultados obtidos. No Anexo 1 são demonstrados os dados obtidos de padrão de expressão das citocinas inflamatórias, filagrina e grau de infiltrado inflamatório.

É necessário ressaltar que a amostra referente ao final do tratamento placebo do animal 5 foi inviabilizada devido a dificuldades encontradas durante os cortes histológicos por congelamento e durante a técnica de imunohistoquímica e coloração de lipídeos, desta forma, este animal não foi incluso nas análises estatísticas para estes parâmetros. No Anexo 2 encontram-se figuras ilustrando a marcação das proteínas filagrina e das citocinas pela técnica de imunohistoquímica e no Anexo 3 encontram-se as figuras demonstrando a coloração de lipídeos pelo corante Sudam Red.

Tabela 3: Análise da distribuição dos escores de expressão das citocinas, da proteína filagrina e dos lipídeos epidérmicos entre os: Dia 0, Dia 45, Dia 90 pelo método de Fisher

Parâmetros	IL4	IL6	IL10	IL31	TNF alfa	Filagrina	Lipídeos
Valor p	0,1873	1,0000	0,5958	0,3629	0,8625	0,7960	0,1773

O teste de correlação de Spearman utilizado para verificar a presença de correlação entre o grau de infiltrado inflamatório e os escores obtidos das citocinas e da filagrina em seus respectivos cortes, demonstrou correlação positiva tão somente para citocina TNF-alfa. Os valores do coeficiente de correlação e valor p são demonstrados na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4: Correlação de Spearman entre o grau de infiltrado inflamatório e escores de citocinas e filagrina em seus respectivos cortes

Variável	Coefficiente de correlação	Valor <i>p</i>
Filagrina	-0,09	0,72
IL4	0,11	0,69
IL6	0,37	0,13
IL10	0,32	0,20
IL31	0,41	0,10
TNF alfa	0,80	0,0001

## 5. DISCUSSÃO

Sobre a composição do grupo amostral que finalizou o estudo, assim como disposto em literatura, a maior parte dos animais foi composto por animais jovens, de raça definida, não havendo distinção sexual entre os animais (HILL et al., 2006; GRIFFIN & DEBOER, 2001).

Com o protocolo de tratamento de células-tronco instituído neste estudo, foi possível observar uma melhora clínica evidente em todos os cães. Foi evidenciado uma tendência a aumento do escore CADESI-4 e da EVPE do início ao término do tratamento-placebo, seguido de diminuição destes parâmetros do início ao término do tratamento com CTM. Diferenças significativas do EVPE e do escore CADESI-4 foram evidenciadas entre o início e término do tratamento com CTM. É importante destacar que embora o grupo de estudo seja composto por um pequeno número de cães, o estudo foi longitudinal, randomizado, duplo-cego, placebo controlado, onde todos os animais incluídos apresentavam a dermatite atópica há mais de 12 meses de evolução, eram refratários aos tratamentos vigentes e não utilizaram nenhum outro tipo de terapia, de forma a influenciar os resultados obtidos.

Vale destacar que a redução da EVPE e do CADESI-4 observada nos animais do estudo foram significativamente maiores que 50% ( $p = 0,0029$  e  $p = 0,0022$  respectivamente) do início ao término do tratamento com CTM. Os animais passaram de prurido considerado como extremamente grave no final do tratamento placebo (nota 9) para muito leve (nota 2,83) ao término da terapia celular, e passaram da classificação de dermatite atópica grave (nota 65) dermatite atópica leve (nota 19,66)<sup>24</sup>. De acordo com os indicativos utilizados atualmente para avaliar sucesso na terapia, baseado na diminuição de redução

maior ou igual a dois centímetros na EVPE, e na redução de 50% do escore lesional CADESI-4, a terapia celular pode ser considerada como uma modalidade de sucesso na dermatite atópica canina, levando a redução de quase 6 cm na escala de prurido e redução significativa de mais de 50% do escore de lesões (COSGROVE et. al., 2013; SOUZA et al., 2018).. A adoção destes critérios de avaliação de eficácia leva em consideração a possibilidade de flutuações sazonais nas manifestações clínicas da dermatite atópica, com alternância de períodos de melhora e piora, evitando-se o efeito placebo, ao mesmo tempo que leva em consideração o fato dos tratamentos atuarem no controle dos sintomas, visto ser a dermatite atópica uma doença crônica, multifatorial e complexa. De forma, que os resultados obtidos em nosso estudo, não podem ser atribuídos a variações sazonais das manifestações clínicas da doença.

O uso de células-tronco no tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas em medicina e em veterinária ainda é incipiente. Os efeitos terapêuticos benéficos observados em nosso estudo estão em concordância com pequeno número de relatos que avaliaram o tratamento de dermatite atópica em medicina veterinária e em medicina (RAMOS et. al 2011; JEE et. al, 2013; VILATTORO et. al, 2018) e em medicina (KIM et. al 2017)..

Em nosso estudo, todos os animais participantes apresentaram melhora clínica satisfatória, com adoção de um protocolo constituído de três aplicações de células-tronco, em intervalos quinzenais. O intervalo quinzenal entre as aplicações foi inferido como intervalo mínimo para obtenção de aparente melhora clínica dos sintomas a partir da observação de um estudo piloto prévio (HALL et al., 2010), sem, contudo, prolongar demasiadamente o tempo de

estudo. Neste estudo piloto prévio, o autor pela falta de observação de melhora clínica consistente em cães tratados com única aplicação de CTM derivadas de tecido adiposo autóloga, sugere que aplicações sequenciais de CTM, talvez fossem necessárias para maximizar os efeitos imunomodulatórios das CTM e assim obter melhores resultados clínicos, e atribui ao insucesso de seu trabalho, o protocolo utilizado quanto ao número de aplicações, dose utilizada e via de aplicação, sendo por este motivo adotado em nosso estudo aplicações sequenciais em um total de três aplicações.

Recentemente, um estudo abrangendo 26 cães com dermatite atópica (VILLATORO et al., 2018), também observou melhora clínica com em redução significativa do escore CADESI e da escala de prurido, com remissão da doença por seis meses com uma única aplicação de CTM heterólogas derivadas de tecido adiposo na dose de  $1,5 \times 10^6$  células por animal, dose menor que a utilizado no presente estudo que foi de  $5 \times 10^6$ . Os estudos com terapia celular para cães com DA ainda são incipientes e ainda se desconhece qual protocolo quanto dose, via de aplicação, número de aplicações, sítio de origem das células-tronco resultam em melhores efeitos terapêuticos. Ainda é incerto se as aplicações sequenciais de célula-tronco resultam em um efeito mais duradouro, o nosso estudo teve duração de 45 dias, embora no contato telefônico posterior com os tutores tenha sido relatado a perpetuação dos efeitos terapêuticos por até um ano sem o uso de outras intervenções terapêuticas. Destarte os resultados animadores, vale ressaltar que a terapia celular assim como as outras terapias para dermatite atópica podem resultar em falhas (HALL et al., 2010; VILLATORO et al., 2018). Os estudos com terapia celular para cães com DA ainda são incipientes e é desconhecido se novos protocolos de terapia celular

serão capazes no futuro de suprimir os casos não responsivos ao tratamento com células-tronco. Estudos sobre a influência da dose, via de aplicação, número de aplicações, sítio de origem das células-tronco, nos efeitos terapêuticos das células-tronco ainda carecem de elucidação.

Em medicina, estudo clínico conduzido com paciente humanos com dermatite atópica observou um efeito terapêutico dose-dependente das células tronco( Kim et al., 2017). Pacientes que receberam uma dose maior de células-tronco ( $5 \times 10^7$  versus  $2,5 \times 10^7$ ), apresentaram uma melhora de 50% no índice de gravidade e área de eczema, uma diminuição de 33% no escore de avaliação global do investigador e uma diminuição de 50% no escore de gravidade da dermatite atópica e redução do prurido em 58%, com o níveis de IgE e número de eosinófilos periféricos diminuindo durante o estudo. Vale destacar que neste estudo, as CTM foram obtidas a partir do cordão umbilical e a via de aplicação utilizada foi subcutânea, o que aponta para um novo campo de pesquisa em medicina veterinária, a fim de avaliar se o sítio de origem das células-tronco, a via de aplicação e diferenças nas doses empregadas podem resultar em diferentes efeitos terapêuticos.

A aplicação das células-tronco foi de fácil execução e aplicação, com a presença de poucos efeitos colaterais. De fato, os efeitos colaterais são reportados como raros tanto em medicina como em veterinária. Diferentemente dos outros autores, neste estudo foi evidenciado efeitos colaterais transitórios. O motivo pelo qual um animal apresentou efeito colateral ainda é incerto, e acredita-se que talvez possam ser decorrentes de uma hipersensibilidade deste animal ao resquício de DMSO, componente utilizado na preservação das células-tronco, que possa ter restado durante o processo de lavagem das CTM

durante o seu preparo, visto que possíveis reações ao DMSO são relatadas em medicina: outra possibilidade é animal ter hipersensibilidade ao soro fetal bovino, componente utilizado no meio de cultivo das células-tronco e também nas soluções de lavagem das células para seu preparo (COX et al., 2012). Todos os parâmetros hematológicos, bioquímicos e de urinálise não apresentaram alterações significativas entre o início e término do estudo, em concordância com outro estudo, que também não evidenciou alterações significativas nos parâmetros hematológicos e de bioquímica sérica em nenhum momento de observação ao longo dos seis meses do estudo (VILLATORO et al., 2018).

Embora tenha sido evidenciada uma melhora significativa dos animais tratados com célula-tronco no que tange aos aspectos clínicos, não foi possível observar alteração da resposta inflamatória cutânea e sistêmica no decorrer do tratamento placebo e com células-tronco. Não foi observada diferenças significativas entre o padrão de expressão das citocinas cutâneas pela técnica de imunistoquímica durante o estudo, o que pode ser atribuído a alguns fatores: local do sítio de coleta de fragmento cutâneo para realização da técnica de imunistoquímica (GONÇALVES et al. 2017), embora seja do conhecimento de que a pele alesional de cães atópicos também apresenta alterações diferindo de uma pele saudável (SHIMADA et al., 2018; REITER, TORRES, WERTZ, 2009; HIGTOWER & MARSELLA, 2010, GHERMPRAPAPAI, et al., 2018); sensibilidade das técnicas empregadas em detectar alterações sutis (MORA, et al., 2007; WHITE et al., 2018); momento de avaliação dos animais que apresentavam a fase crônica da doença, sendo muitas das citocinas estudadas serem do tipo Th2, associadas com a fase aguda da doença e por fim características de variabilidade inerentes das citocinas que apresentam

liberação dinâmica pelas células do sistema imune e tempo de meia vida curtos (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Por fim, o pequeno número de estudos que avaliam o efeito de tratamentos imunomoduladores na resposta inflamatória quer sistêmica ou cutânea em cães com dermatite atópica dificulta a realização de comparações e a justificativa para estes achados.

Semelhantemente ao nosso estudo, um outro estudo (WHITE et al., 2018) avaliando a eficácia de um tratamento oral imunomodulador em cães atópicos, comparando sinais clínicos pelo CADESI-3 e perfil de citocinas pró-inflamatórias pela técnica de RT-PCR não detectaram alterações no padrão de expressão de mRNA das citocinas entre cães atópicos que receberam tratamento com imunomodulador e cães atópicos que receberam placebo, embora a melhora clínica fosse evidenciada no grupo tratado com imunomodulador, e atribuiu este achado à complexidade da dinâmica das citocinas durante as diferentes fases de evolução da doença ou que talvez um tempo maior de imunomodulação possa ser necessária para a observação de diferenças significativas no padrão de expressão das citocinas e da barreira cutânea destarte a melhora clínica.

Embora o sítio anatômico e o grau da inflamação possam ser considerados como fatores que possam influenciar o padrão de expressão das citocinas estudadas e da filagrina, em nosso estudo, somente foi observado correlação positiva entre o grau de infiltrado inflamatório com a expressão da citocina TNF-alfa, uma possível explicação para este achado é o fato dos animais do estudo apresentarem a doença na forma crônica, com mais de 12 meses de evolução, fase associada com a presença de resposta do tipo Th1 ( NUTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al, 2011; PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Embora não se tenha observado alterações na resposta inflamatória cutânea pelas citocinas estudadas, sabe-se que o mecanismo de ação das células-tronco são amplas, e a melhora clínica observada nos animais com dermatite atópica pode ser atribuída às outras propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias das células-tronco, como: diminuição da proliferação, maturação e atividades das células dendríticas, diminuição da ativação e proliferação das células T ( RASMUSSEN, 2006; AGGARWAL & PITTENDER, 2015, SHIN et al., 2017b), diminuição da produção de outros mediadores inflamatórios como iNOS, eNOs, INFC, NOX4 (JEE et al., 2013), diminuição da degranulação de mastócitos (KIM et al., 2015), diminuição da proliferação de linfócitos B e produção de IgE (SHIN et al. 2017<sup>a</sup>), aumento de TGF-beta e PGE2 (KIM et al., 2015).

Também não foram detectadas alterações na barreira cutânea com o tratamento das CTM, não sendo observadas alterações significativas no padrão de expressão da proteína filagrina e nem nos lipídeos epidérmicos durante o tratamento com placebo e com CTM. Devido às propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras das células-tronco, esperava-se observar uma melhora do padrão inflamatório cutâneo, com consequente, aumento da expressão da proteína filagrina e aumento dos lipídeos epidérmicos, visto que na dermatite atópica em cães acredita-se que as alterações de barreira cutânea possam ser secundárias ao processo inflamatório, pelas influência epigenéticas na produção de filagrina e pelo desequilíbrio entre as enzimas de síntese e catabolismo dos lipídeos, da filagrina e do processo de disqueratinização (MERRYMAN-SIMPSON et al., 2001; MARSELLA, SAMUELSON, HARRINGTON, 2009; MARSELLA, OLIVRY, CARLOTTI, 2011; CHERMPRAPAI et al., 2018). De forma

que, a falta de observação de alteração na resposta inflamatória cutânea neste estudo pode justificar a ausência de alteração na barreira cutânea. Entretanto, há carência de estudos dos efeitos dos tratamentos imunomoduladores sistêmicos em relação à barreira cutânea de cães com dermatite atópica, sendo desconhecido se tratamentos de ordem sistêmica são efetivamente capazes de melhorar a camada lipídica e a expressão da proteína filagrina e em quanto tempo este efeito, se existente, poderia ser observado.

## **6.CONCLUSÃO**

O tratamento com CTM com o protocolo utilizado foi benéfico para a melhora das manifestações clínicas nos animais com dermatite atópica, diminuindo de forma significativa e contundente o escore CADESI-4 e EVPE ao término do tratamento com células-tronco. A melhora clínica evidente nos animais com dermatite atópica tratados com terapia celular aliados à baixa frequência de efeitos colaterais, sinaliza que as CTM possam ser consideradas como uma modalidade terapêutica para o tratamento da dermatite atópica canina. Neste estudo não foi visualizada alterações significativas da inflamação cutânea por meio da avaliação das citocinas e nem barreira cutânea durante o curso de tratamento com as CTM.

## 7.BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, A., PITTENDER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

AISENSTADT A.A, SUPILNIKOVA, O.V; BAGAEVA, V.V; SMOLJANINOV, A.B; SAMOYLOVICH, M.P; KLIMOVICH, V.B. Mesenchymal stem cells influence on leukocytes allergen-specific reactions in case of atopic hypersensitivity. **Tsitologija**, v. 57, n. 3, p. 197-203, 2015(Abstract)

AKDIS, C.A.; AKDIS, M.; BIEBER, T.; BINDSLEV-JENSEN, C.; BOGUNIEWICZ, M.; EIGENMANN, P.; HAMID, Q.; KAPP, A.; LEUNG, D.Y.; LIPOZENCIC, J.; LUGER, T.A.; MURARO, A.; NOVAK, N.; PLATTS-MILLS, T.A.; ROSENWASSER, L.; SCHEYNIUS, A.; SIMONS, F.E.; SPERGEL, J.; TURJANMAA, K.; WAHN, U.; WEIDINGER, S.; WERFEL, T.; ZUBERBIER, T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/Practical Consensus Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 61, p. 969-989, 2006.

BADERTSCHER, K., BRONNIMANN, M., KARLEN, S. BRAATHEN, L. R.; YAWALKAR, N. Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis. **Archives of Dermatologic Research**, v. 296, n. 10, p. 503-506, 2005.

BARBOSA, L. C. Análise imunoiistoquímica da proteína interleucina 31 e filagrina e sua relação como 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. Botucatu, 2015. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

BARROS ROQUE, J., O'LEARY, C.A., KYAW-TANNER, M. Haplotype sharing excludes canine orthologous Filaggrin locus in atopy in West Highland White Terriers. **Animal Genetics**, v.40, p. 793-794, 2009.

BOTONI, L.S.; TORRES, S.M.F.; KOCK, S.N.; HEINEMANN, M.B.; COSTA-VAL, A.P. Comparison of demographic data, disease severity and response to treatment, between dogs with atopic dermatitis and atopic-like dermatitis: a retrospective study. **Veterinary Dermatology**, v. 30, p. 10-e4, 2019.

CARR, M.N.; TORRES, S.M.; KOCH, S.N.; REITER, L.V. Investigation of the pruritogenic effects of histamine, serotonin, tryptase, substance P and interleukin-2 in healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v.20, n. 02, p.105 -110, 2009.

CAUBET, C., JONCA, N., BRATTSAND, M., GUERRIN, M.; BERNARD, D.; SCHMIDT, R.; EGERULD, T.; SIMON, M.; SERRE, G. Degradation of corneodesmosome proteins by two series proteases of the kallicrein family, SCTE/KLL5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **Journal of Investigative Dermatology**, v.122, n. 5, p. 1235-1244, 2004.

CHERMPRAPAI, S.; BROERE, F.; GOORIS, G.; SCHLOTTER, Y.M.; RUTTEN, V.P.M.G.; BOUWSTRA, J.A. Altered lipid properties of the stratum corneum in canine atopic dermatitis. **Biomembranes**, v. 1860, p.526-533, 2018.

CHOI, M. J., MAIBACH, H., L. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 6, p. 215-223, 2005.

CORDECH, L., LOPEZ, O., DE LA MAZA.; PARRA, J.L. Ceramides and skin function. **American journal of Clinical Dermatology**, v. 4, p. 107-129, 2003.

CHOW, L.; JHONSON, V.; REGAN, D.; WHEAT, W.; WEBB, S.; KOCH, P.; DOW, S. Safety and immune regulatory properties of canine induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. **Stem cell Research**, v. 25, p. 221-232, 2017.

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

COX, M.A.; KASTRUP, J.; HRUBIŠKO, M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. **Cell Tissue Bank**, v. 13, n. 2, p. 203-215, 2012.

CORNEAGLINI, L.; VERCELLI, A.; SALA, E.; MARSELLA, R. Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative study. **Veterinary Dermatology**, v.23, n. 1, p.41-e10, 2012.

COSGROVE, S.B; WREN, J.A.; CLEAVER, D.M.; WALSH, K.F.; FOLLIS, S.I.; KING, V.I.; TENA, J.K.; STEGEMANN MR. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel) in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n.6, p.587-e142, 2013.

DEVIREDDY, L.R., BOXER, L., MYERS, M.J., SKASKO, M., SCREVEN, R. Questions and challenges in the development of mesenchymal stroma/stem cell-based therapies in veterinary medicine. **Tissue Engineering**, v.23, n.4, p. 1-9, 2017.

DILLON, S.R.; SPRECHER, C.; HAMMOND, A.; BILSBOROUGH, J.; ROSENFELD-FRANKLIN, M.; PRESNELL, S.R.; HAUGEN, H.S.; MAURER, M.; HARDER, B.; JOHNSTON, J.; BORT, S.; MUDRI, S.; KUIJPER, J.L.; BUKOWSKI, T.; SHEA, P.; DONG, D.L.; DASOVICH, M.; GRANT, F.J.; LOCKWOOD, L.; LEVIN, S.D.; LECIEL, C.; WAGGIE, K.; DAY, H.; TOPOUZIS, S.; KRAMER, J.; KUESTNER, R.; CHEN, Z.; FOSTER, D.; PARRISH-NOVAK, J.; GROSS, J.A .Interleukin 31, a cytokine produced by

activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology*, v.5, n. 7, p. 752-760, 2004.

DUFFY, M.M.; RITTER, T.; CEREDIG, R.; GRIFFIN, M.D. Mesenchymal stem cells effects on t-cell effector pathways. ***Stem cell Research***, v.2, n.4, p. 34, 2011.

FARTASCH, M., BASSUKAS, I.D., DIEPGEN, T.L. Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. ***British Journal of Dermatology***, v.127, p. 221-227, 1992.

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

FUJIMURA, M.; NAKATSUJI, Y.; FUJIWARA, S.; RÈME, C.; GATTO, H. Spot-on skin lipid complex as an adjunct therapy in dogs with atopic dermatitis: an open pilot study. ***Veterinary Medicine International***, v. 2011: 281846, 2011.

GEDEON, N.K.Y.; MUELLER, R. S. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. ***Clinical and Translational Allergy***, v.8, p. 41, 2018

GIBSON-CORLEY, K.N.; OLIVIER, A.K. MEYERHOLZ, D.K. Principles for valid histopathologic scoring in research. ***Veterinary Pathology***, v.50, n. 6, p. 1007-1015, 2013.

GONÇALVES, B.H.R.; MATOS, B.D.; FALEIRO, M.B.R.; ARNHOLD, E.; MATOS, M.P.C.; SANTIN, A.P.I.; MOURA, V.M.B.D. Correlation between clinical findings, mast cell count and interleukin 31 immunostaining in the skin of dogs with atopic dermatitis. ***Ciência Rural***, v. 48, p. 1-9, 2017.

GONZALES, A.J.; HUMPHREY, W.R.; MESSAMORE, J.E.; FLECK, T.J.; FICI, G.J.; SHELLY, J.A.; TEEL, J.F.; BMMERT, G.F.; DUNHAM, S.A.; FULLER,

T.E.; MCCALL, R.B. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 48-53, 2013.

GRIFFIN, CE.; DEBOER, DJ: The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 81, n. 3-4, p. 255-269, 2001.

GRIFFIN, C.E.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 1, p. 363 – 383, 2001.

GRIZZLE, W.E. Models of Fixation and Tissue Processing. *Biotechnology Histochemistry*, v. 84, n. 5, p. 185-193, 2009.

GUGJOO, M.B.; AMARPAL, A.; SHARMA, GT. Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. **Journal of Cell Physiology**, p. 1-33, 2019

HALL, M.N., ROSENKRANTZ, W.S., HONG, J.H., GRIFFIN, C.E., MENDELSON, C.M. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. **Veterinary Therapeutics**, v.11, n.2, p.E1-E14, 2010.

HALLIWELL, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n.3-4, p. 207-208, 2006.

HARA, J.; HIGUCHI, K.; OKAMOTO, R.; KAWASHIMA, M.; IMOKAWA, G. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. **Journal Investigative Dermatology**, v. 115, p. 406-413, 2000.

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

HIGHTOWER, K., MARSELLA, R., CREARY, E.; DUTCHER, P. Evaluation of transepidermal water loss in canine atopic dermatitis: a pilot study in Beagle

dogs sensitized to house dust mites. **Veterinary Dermatology**, v.21, p. 89-86, 2010.

HILL, P.B.; OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 187-198, 2001.

HILL, P.B.; LO, A.; EDEN, CA.; HUNTLEY, S.; MOREY, V.; RAMSEY, S.; RICHARDSON, C.; SMITH, D.J.; SUTTON, C.; TAYLOR, M.D.; THORPE, E.; TIDMARSH, R.; WILLIAMS, V. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in a small animals in general practice. **Veterinary Records**, v. 158, n.16, p. 533-539, 2006.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. the ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 81, 147-151, 2001.

HILLIER, A. Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. **Veterinary Medicine**, v.97, n.3, p. 210-224, 2002.

HOFFMAN AM, DOW SW. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. **Stem Cells**, v. 34, n. 7, p. 1709-1729, 2016.

HOMEY, B.; STEINHOFF, M.; RUZICKA, T.; LEUNG, D.Y.M. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.118, p.178-189, 2006.

HOWELL, M.D.; KIM, B.E.; GAO, P.; GRANT, A.V.; BOGUNIEWICZ, M.; DEBENEDETTO, A.; SCHNEIDER, L.; BECK, L.A.; BARNES, K.C.; LEUNG, D.Y. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n 1, p. 150-155, 2009.

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. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, vol. 29, n. 4, p. 577-580, 1981a.

HSU, S-M.; RAINE, M.D.; FANGER, H. The Use of Antiavidin Antibody and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Immunoperoxidase Technics. **American Journal of Clinical Pathology** ,v. 75, n. 6, p. 816-821, 1981b.

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

IMOKAWA, G. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. **Journal Dermatology Science**, v. 55, n. 1, p.1-9, 2009.

JAEGER, K.; LINEK, M.; POWER, H.T.; BETTENAY, S.V.; ZABEL, S.; ROSYCHUK, R.A.; MUELLER, R.;S. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of the locations in three continents. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 119-123, 2010.

JEE, M.K.; IM, Y.B.; CHOI, J.I.; KANG, S.k. Compensation of cATSCs-derived TGFb1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatites. *Cell Death and Disease*, v.4, p. 497, 2013.

JENSEN, J.M., FOLSTER-HOLST, R., BRANOWSKY, A.; SCHUNCK, M.; WINOTO-MORBACH, S.; NEUMANN, C.; SCHÜTZE, S.; PROKSCH, E. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 1423-1431, 2004

JUNG, J.Y.; NAM, E.H.; PARK, S.H.; HAN, S.H.; HWANG, C.Y. Clinical use of a ceramide-based moisturizer of treating dogs with atopic dermatitis. **Journal Veterinary Science**, v. 14, p.199-205, 2013.

KANG, J.W.; KANG, K.S.; KOO, K.C.; PARK, J.R.; CHOI, E.W.; PARK, Y.H. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Stem cells and Development**, v. 17, n.4, p. 681-694,2008.

KAWASAKI, H.; KUBO, A.; SASAKI, T.; AMAGAI, M. Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis. **Current Problems in Dermatology**, v. 41, p. 35-46, 2011.

KIDO-NAKAHARA, M.; FURUE, M.; ULZII, D.; NAKAHARA, T. Itch in Atopic Dermatitis. **Immunology Allergy Clinical North America**, v, 37, n. 1, p.113-122, 2017.

KIM, S. W.; ROH, J.; PARK, C. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, p. 411-418, 2016.

KIM, K.H.; BLASCO-MORENTE, G.; CUENDE, N.; ARIAS-SANTIAGO, S. Mesenchymal stromal cells: properties and role in management of cutaneous diseases. **Journal European Academy Dermatology Venereology**, v. 31, n.3, p. 414-423, 2017a.

KIM, H.S.; YUN, J.W.; SHIN, T.H.; LEE, S.H.; LEE, B.C.; YU, K.R.; SEO, Y.; LEE, S.; KANG, T.W.; CHOI, S.W.; SEO, K.W.; KANG, K.S. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- $\beta$ 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. **Tissue Specific Stem Cells**, v. 33, p. 1254-1266, 2015.

KIM, H.S.; LEE, J.H; ROH, K.H.; JUN, H.J; KANG, K.S; KIM, T.Y. Clinical Trial of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells for the Treatment of Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: Phase I/IIa Studies. **Stem Cells**, v. 35, n. 1, p. 248-245, 2017b.

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

KLINGER, C. Mesenchymal stem cells: a potential therapy for canine atopic dermatitis? **Veterinary Records**, v. 183, n.21, p. 651-653, 2018.

KUMAR, S.; SINGH, N.P. Review article stem cells: a new paradigm. **Indian Journal of human genetics**, v.12, n. 27, p. 4-10, 2006.

LELBACHER, J.; HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. **Stem cells Research Therapy**, v.7, p. 7, 2016.

LINEK, M.; FAVROT, C. Impact of canine atopic dermatitis on the health-related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.456-462, 2010.

MCNALLY NJ, PHILLIPS DR, WILIAMS HC. The problem of atopic eczema: a etiological clus from the environment and lifestyles. **Social Science & Medicine**, v. 46, n. 6, p. 729-741, 1998.

MARSELLA, R., NICKLIN, C., LOPEZ, J. Studies on the routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 306-312, 2006.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; HARRINGTON, L. Evaluation of filaggrin expression in sensitized atopic Beagles and in normal controls before and after allergen exposure. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 547-554, 2009.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; DOERR, K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 81-88, 2010.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; CARLOTTI, D.N. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p. 239-248. 2011.

MARSELLA, R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 266-e59, 2013.

MARSELLA, R.; DE BENEDETTO, A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. **Veterinary Science**, v. 4, n. 3, 2017.

MASUKAWA, Y.; NARITA, H.; SHIMIZU, E.; KONDO, N.; SUGAI, Y.; OBA, T.; HOMMA, R.; ISHIKAWA, J.; TAKAGI, Y.; KITAHARA, T.; TAKEMA, Y.; KITA, K. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 1466-1476, 2008.

MASUKAWA, Y.; NARITA, H.; SATO, H.; NAOE, A.; KONDO, N.; SUGAI, Y.; OBA, T.; HOMMA, R.; ISHIKAWA, J.; TAKAGI, Y.; KITAHARA T. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 1708-1709, 2009.

MERRYMAN-SIMPSON, A. E.; WOOD, S.H.; FRETWELL, N.; JONES, P.G.; MCLAREN, W.M.; MCEWAN, N.A.; CLEMENTS, D.N.; CARTER, S.D.; OLLIER, W.E.; NUTTALL, T. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. **Veterinary Dermatology**, v.19, p.59-66, 2008.

MERRYMAN-SIMPSON, A.E.; WOOD, S.H.; FRETWELL, N.; OLIVRY, T.; HILL, P.B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: is the epidermal lipid barrier defective? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 215-218, 2001.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, E.C.; CAMPBELL, K.L. *Small Animal Dermatology*, 7ed St. Louis: Elsevier Mosby, 2013.

MORA, F.; FUENTE, C.; JASMIN, P.; GATTO, H.; MARCO, A.; FERRER, L.; FONDATI A.; FONDEVILA, D.; TORRES, R. Veterinary 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. **Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 223–229, 2007.

NA, K.; YOO, H.S.; ZHANG, Y.X.; CHOI, M.S.; LEE, K.; YI, T.G.; SONG, S.U.; JEON, M.S. Bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit ovalbumin-induced atopic dermatitis. **Cell Death Disease**, v.17, n.5, p. 1345, 2014.

NEMOTO-HASEBE, I.; AKYAMA, M.; NOMURA, T.; SANDILANDS, A.; MCLEAN, W. H. I.; SHIMIZU, H. Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, .3, p. 682-689, 2009.

NUTTALL, T.J.; KNIGHT, P.A.; MCALEESE, S.M.; LAMB, J.R.; HILL, P.B. Expression of the Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 5, p. 789-795, 2002.

NUTTALL, T.J.; KNIGHT, P.A.; MCALEESE, S.M.; LAMB, J.R.; HILL, P.B. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 379-384, 2002.

OLIVRY, T.; DEAN, G.A.; TOMPKINS, M.B.; DOW, J.L.; MOORE, P.F. Toward a canine model of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. **Experimental Dermatology**, v. 8, p. 204-211, 1999.

OLIVRY, T.; SOUZA, C. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.81, p. 317-322, 2001.

OLIVRY, T.; DEBOER, D.J.; GRIFFIN, C.E.; HALLIWELL, R.E.; HILL P.B.; HILLIER, A.; MARSELLA, R.; SOUSA, C.A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.81, p. 143-146, 2001.

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 *et al.* Severity Index (CADESI)-assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, 2014, 25: 77-e25

OLIVRY, T.; DEBOER, D.J.; FAVROT, C.; JACKSON, H.A.; MUELER, 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.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTTALL, T.; BENSIGNOR, E.; GRIFFIN, C.E.; 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.

ORCIANI, M.; CAMPANATI, A.; CAFFARINI, M.; GANZETTI, G.; CONSALES, V.; LUCARINI, G.; OFFIDANI, A.; DI PRIMIO, R. T helper (Th)1, Th17 and Th2 imbalance in mesenchymal stem cells of adult patients with atopic dermatitis: at the origin of the problem. **British Journal of Dermatology**, v. 176, n. 6., p. 1569 – 1576, 2016.

PALMER, C.N.; IRVINE, A.D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A.; ZHAO, Y.; LIAO, H.; LEE, S.P.; GOUDIE, D.R.; SANDILANDS, A.; CAMPBELL, L.E.; SMITH, F.J.; O'REGAN, G.M.; WATSON, R.M.; CECIL, J.E.; BALE, S.J.; COMPTON, J.G.; DIGIOVANNA, J.J.; FLECKMAN, P.; LEWIS-JONES, S.; ARSECULERATNE G, SERGEANT A, MUNRO CS, EL HOUATE B, MCELREAVEY, K.; HALKJAER, L.B.; BISGAARD, H.; MUKHOPADHYAY, S.; MCLEAN, W.H. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 441-446, 2006.

PIEKUTOWSKA, A.; Pin, D.; Rème, C.A.; Gatto, H.; Haftek, M. Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier

of atopic dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v, 138, n. 8, p. 197-203, 2008.

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

RAMOS, F.; SANTOS, A.L.; MALARD, P. F.; BARJUD, G.R.S.; FERREIRA, R.F.; OLIVEIRA, C.A.M. Aplicação de célula-tronco mesenquimais em caso de cão com dermatite atópica e otite recorrente – relato de caso. Anais 37 Congresso Brasileiro da Anclivepa, Goiânia, GO, p. 0322, 2011

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v.312, p. 2169-2179, 2006.

REITER, L.V.; TORRES, S.M.F.; WERTZ, P.C. Characterization and quantification of ceramides in the non-lesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared to controls. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p 260-266, 2009.

REME, C.A.; MONDON, A.; CALMON, J.P. Efficacy of combined topical therapy with antiallergic shampoo and lotion for the control of signs associated with atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, v.15, S33, 2004.

RYBNÍČEK, J. Further validation of a pruritis 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.C.; NUTTALL, T.; BIZIKOVA, P. Review: pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 84-e25, 2015.

SANTORO, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: an Update. **Veterinary Clinics of Clinical Small Animal**, v. 49, p. 9-26, 2019.

SANTORO, D., MARSELLA, R., BUNICK. Expression and distribution of canine filaggrin in the skin of healthy and atopic beagles. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 323, 2010

SANTORO, D.; HOFFMANN, A.R. Canine and human atopic dermatitis: two faces of the same host-microbe interaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, p. 1087 -1089, 2016.

SALVADOR, C.M. Padronização de técnica de histoquímica de mensuração de lipídeos da epiderme de cães e mensuração de lipídeos da epiderme de cães atópicos antes e após reposição tópica de lipídios e ceramidas. Botucatu, 2014, 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SCHLOTTER, Y.; RUTTEN, V.P.M.G.; RIENERS, F.M.; KNOL, E.F.; WILLEMSE, T. Lesional skin in atopic dogs showed a mixed type-1 and type-2 immune responsiveness. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, p. 20-26, 2011.

SHIMADA, K.; YOON, J.S.; YOSHIHARA, T.; IWASAKI, T.; NISHIFUJI, K. Increase in transepidermal water loss and decrease in ceramide content in the lesional and non-lesional skin of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v.20, p. 541-546, 2009.

SHIN, T.H.; LEE, B.C.; CHOI, S.W.; SHIN, J.H.; KANG, I.; LEE, J.Y.; KIM, J.J.; LEE, H.K.; JUNG, J.E.; CHO, I Y.W.; LEE, S.H.; YOON, J.S.; CHOI, J.S.; LEE, C.S.; SEO, Y.; KIM, H.S.; KANG, K.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. **Oncotarget**, v. 3, n. 8, p. 512-522, 2017.

SHIN, T.H.; KIM, H.S.; CHOI, S.W.; KANG, K.S. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. **International Journal of Molecular Science**, v. 25, n. 18, p. E244, 2017.

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

SOUZA, C.P.; ROSYCHUK, R.A.; CONTRERAS, E.T.; SCHISLER, 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 dog in the western USA. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 489 – e164, 2018.

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

VILLATORO, A.J.; PRIETO-HERMIDA, M.; FERNANDEZ, V.; FARINAS, F.; ALCOHOLADO, C.; RODRIGUEZ- GARCIA, M.IS.; MARINAS- PARDO, L.; BECERRA, J. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. **Veterinary Records**, v. 183, p. 1-7, 2018.

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

WILHEN, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C. Breed-associate phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p. 143-149, 2010.

WOOD, S.H., CLEMENTS, D.N., OLLIER, W.E.; NUTTALL, T.; MCEWA, N.A.; CARTER, S.D. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. **Journal of Dermatological Science**, v.55, p. 27-33, 2009.

## 9. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Científico a ser enviado para a revista “Veterinary Dermatology”. Site da Revista:

[https://onlinelibrary.wiley.com/journal/101111\(ISSN\)13653164](https://onlinelibrary.wiley.com/journal/101111(ISSN)13653164).

As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link:

[https://onlinelibrary.wiley.com/journal/101111\(ISSN\)13653164.5-3164/homepage/forauthors.html](https://onlinelibrary.wiley.com/journal/101111(ISSN)13653164.5-3164/homepage/forauthors.html).

### **Evaluation of the use of mesenchymal stem cell in clinical manifestations, skin barrier and inflammatory response in atopic canine dermatitis: a longitudinal, double-blind, randomized, placebo-controlled study.**

OLIVEIRA, C. D. O. †, MACHADO, L, H. A. †, BERBEL, B.†, FONSECA, C. E.†, BRITO, M. A. ‡, PANATONNI, J.F.P‡, MORAIS, B.P.M.‡.

#### **Acknowledgements**

To the Department of Veterinary Pathology - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Paulista State University “Júlio De Mesquita Filho” - Botucatu / SP

Department of Clinical Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Paulista State University “Júlio De Mesquita Filho”. Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR. 18618-681.

Regenera Stem cell, Rua Baguaçu, 26 – Alphaville Empresarial, Edifício Business Center II – sala 101, Campinas-SP.

Correspondence: CDO, Department of Clinical Medicine, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR. 18618-681. Phone: (+55) 14 3880-2043. [camiladominguesvet@gmail.com](mailto:camiladominguesvet@gmail.com)

#### **Funding source**

**FAPESP – São Paulo State Research and Support Foundation, Brazil.**

**Conflict of Interest:**

Regenera Stem Cells, Campinas, Brazil – private company donating stem cells used in this study.

**Abstract**

**Background:** The atopic canine is an inflammatory allergic dermatitis frequent and important. The distinct treatment available is symptomatic, sometimes is unsatisfactory in the control of the disease and susceptible to the collateral effects. Mesenchymal Stem cells are immune evasives, and have potent immunosuppressant, and anti-inflammatory action, and can be used in the treatment of autoimmune, inflammatory and degenerative diseases.

**Hypothesis:** The mesenchymal stem cells (MSCs) by their immunomodulators and anti-inflammatory characteristics can be beneficial in the treatment of atopic dogs.

**Methods:** A longitudinal, double-blinded, randomized, placebo-controlled study was performed, with an initial period of placebo treatment within saline solution 0,9%, after the application of allogeneic canine adipose MSCs (cAd-MSCs), derived from adipose tissue, in 6 dogs with atopic dermatitis. Each treatment of cAd-MSCs constituted of 3 applications of  $5 \times 10^6$  cell per animal, in by-weekly intervals. The owners assessed visual analog scale (VAS) scores of pruritus, the clinicians assessed canine AD extent and severity index scores (CADESI-04), the skin inflammatory response through the measurements of cytokines IL4, IL6, IL10, IL31, Tnf-alfa by immunohistochemistry; the blood dosage of IL1 IL4, IL6, IL10, IL17, IL31, Tnf-alfa, IFN-gama by ELISA and evaluation of the skin barrier by of coloration of lipids by the Sudam III and filaggrin by immunohistochemistry were compared between the placebo treatment and the cAd-MSCs treatment.

**Results:** The treatment with cAd-MSCs with the used protocol was beneficial to the improvement of the clinical responses of the animals with atopic dermatitis, decreasing significantly ( $p > 0,05$ ) the CADESI-4 and VSA score between start and end of stem cell treatment. On the end of the study with stem cells, was noticed a reduction baseline in owner-assessed pruritus scores (VSA) and the clinicians assessed canine AD extent and severity index scores (CADESI-4) of 68,5% and 72% respectively. No significant differences were noticed in cytokines expression by immunohistochemical and ELISA neither in lipids epidermics nor filaggrin between placebo and treatment with stem cells.

**Conclusion:** In this study, the clinical improvement was evident in animals with DA treated with cellular therapy allied to the low frequency of the collateral effects, indicates that with cAd-MSCs can be considered as a therapeutic category very promising in the future for the treatment of the atopic canine dermatitis. With the used methodology weren't noticed significant changes in the skin inflammation through the evaluation of the cytokines type TH1 and TH2 neither significant changes in the expression of the filaggrin protein as well as in the epidermic lipids. Post-studies are required to evaluate if the results obtained

would be different in case of a larger period of analysis or using another methodology.

## Introduction

Canine atopic dermatitis is an important chronic inflammatory dermatopathy in dogs, due to its prevalence and impact on the quality of life of animals and their respective owners<sup>1</sup> It has well-defined clinical characteristics, often associated with hypersensitization to environmental allergens<sup>2-5</sup>. It is a complex and multifactorial disease, in which interactions between various factors - genetic, skin, immunological, neurological and environmental - contribute in varying degrees to its manifestation<sup>1-5</sup>. Animals with atopic dermatitis present cutaneous and systemic alterations in lymphocyte populations, with production of complex TH1, Th2, Th17 cytokine network and interacting regulatory T lymphocytes.<sup>7-12</sup>

Atopic dermatitis is a chronic disease and its treatment aims to establish disease control and improve animal welfare. One of the pillars of treatment is the use of anti-inflammatory and antipruritic therapies, using immunomodulatory drugs, such as: glucocorticoids, cyclosporine, oclacitinib, use of monoclonal antibodies and specific allergen immunotherapy<sup>13-16</sup>. Although there are several treatment modalities, sometimes the response to them may be partial or even absent, so that new therapeutic modalities that present as characteristics: minimal side effects, lasting disease control, do not need to be administered daily in order to improve the quality and welfare of animals and their respective owners that are still needed<sup>1,13</sup>.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells, present in different adult tissues, participating in the physiological process of cellular repair and maintenance of mammalian tissues and endowed with regeneration and differentiation capacity in specialized tissues. Because they are a heterogeneous population, the International Society Cellular Therapy (ISCT) has established standardization criteria, so that to be considered MSCs, these cells must have certain characteristics such as: adhesion to plastic in cell cultures, expression of membrane markers such as: CD73, CD105, CD 90, absence of CD14, CD34, CD45, CD11b, CD79A, HLA-DR, and being capable of *in vitro* differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts<sup>17-20</sup>.

MSCs are immune evasive cells, do not express MHC class II, do not express costimulatory molecules such as CD40, CD80, CD86 and express MHC class I molecules in small quantities. These characteristics enable their therapeutic use, allowing them to be used heterologously<sup>17-20</sup>.

In addition to their ability to regenerate and differentiate, stem cells are known to have potent anti-inflammatory and immunosuppressive action, and these actions are considered more relevant for their therapeutic use. Through direct cell-to-cell contact or paracrine secretion of immunoregulatory mediators, MSCs decrease the production of proinflammatory cytokines by immune cells, the maturation, proliferation, and activity of antigen presenting cells. Decrease lymphocyte and plasma cell proliferation and activity, increase the population of regulatory T lymphocytes and the production of anti-inflammatory cytokines such as IL10<sup>17-24</sup>.

Given the anti-inflammatory and immunosuppressive action properties of stem cells and their wide application potential, this study aims to investigate the

effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the clinical response, epidermal barrier, and in the skin inflammation of dogs with atopic dermatitis.

## **Materials and Methods**

### **Subjects, Study Site and Inclusion Criteria**

It was conducted a longitudinal, double-blind, randomized, placebo-controlled study with six dogs diagnosed with atopic dermatitis selected at the Dermatology Service of the Veterinary Hospital of FMVZ campus UNESP Botucatu. The study was approved by the Animal Ethics Committee of FMVZ / UNESP campus Botucatu, under protocol #131/2015. All owners were duly informed and signed the informed consent form, authorizing the animal's participation in the study and the necessary examinations. The diagnosis of atopic dermatitis was established after the exclusion of pruritic dermatopathies and other allergic diseases, such as flea allergy dermatitis and food hypersensitivity, and according to the criteria established by Favrot et al. 2010<sup>24</sup>. All animals and in overall good health, with no distinction as to race, age and gender. For inclusion in the study, animals should be about 30 days without use of any antipruritic drugs. No other treatment was allowed during this study, except for the regular maintenance of ectoparasiticides and the use of 3% chlorhexidine shampoo, which were previously used during the phase of hydrolysed dietary allergy exclusion for a period of 8 weeks.

### **Experimental Design**

The dogs included in the study underwent two types of treatment at different times. First, the animals underwent placebo treatment, consisting of three applications of 2 ml intravenous saline solution 0,9% at biweekly intervals, performed on days 0, 15 and 30 of the study. Subsequently, these same animals received three applications of peripheral intravenous cryopreserved of allogeneic adipose tissue-derived MSCs (cAd-MSCs) (Regenera®, Brazil) at a dose of  $5 \times 10^6$  cells per animal at biweekly intervals, applied on days 45, 60 and 75 of this study. During the study, neither the owners nor the clinician responsible for applying the cells were aware of the experimental design.

During the study, to evaluate the safety and effectiveness of MSC therapy, the animals were evaluated biweekly by laboratory tests (blood count, biochemical analysis and urinalysis), physical and dermatological examination, with quantification of the tegumentary lesions through the CADESI-4<sup>25</sup> lesion score by the clinician and the use of visual analog scale (VAS) score of pruritus<sup>26</sup> attributed by the respective owners. The experimental design can be seen in the supplementary figure 1.

### **Stem cells**

The mesenchymal stem cells were provided by the private company REGENERA® (Campinas, Brazil). Mesenchymal stem cells were derived from abdominal adipose tissue. Once obtained, the stem cells were isolated, identified and cultured according to the recommendations of the International Society Cellular Therapy (ISCT) following the criteria of characterization of stem

cells as positive expression of markers CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, NG2, Vimentina, Nestina, SOX2, SOX9, SOX17 and negative for markers CD45, CD34, CD144, CD11b, immunofluorescence and flow cytometry techniques, and are tested for their ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes *in vitro*<sup>15-20</sup>. Cells were also screened for pathogen and contaminant clearance. After characterization, cells were cryopreserved at  $2 \times 10^6$  cells / ml in cryogenic medium [10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 40% fetal bovine serum and DMEM-H] and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

For its application, the mesenchymal stem cells were thawed in a  $37^\circ\text{C}$  water bath for two minutes, and immediately transferred to the company's supplied thawing solution and centrifuged at 1200 RPM for 5 minutes. After discarding the supernatant, the stem cells were double-washed with the same wash solution, followed by centrifugation at 1200 RPM for five minutes. After completion of the washing process, the resulting pellet was re-suspended with 02 ml of physiological solution for application. After preparation, the cells were immediately applied to dogs previously catheterized intravenously. Intravenous cAd-MSCs was administered at a dose of  $5 \times 10^6$  cells / animal, slowly through a 3 ml syringe coupled to a 40 x 12 cm needle to prevent cell damage.

### **Collection of cutaneous fragments**

For analysis of the inflammatory response of the skin and analysis of epidermal lipids, skin fragments were collected by dorsal cervical biopsy after local anesthetic infiltration based on lidocaine (Lidovet®, Bravet, Engenho Novo, Rio de Janeiro, Brazil) on days 0, 45, and 90, corresponding respectively to: first placebo treatment, end of placebo treatment / start of cAd-MSCs treatment and end of cAd-MSCs treatment.

### **Immunohistochemistry**

Skin inflammatory response was assessed by the expression pattern of cytokines of the type Th1 (TNF- alfa), Th2 (IL31, IL4, IL6) and T reg (IL 10) and the skin barrier was evaluated by filaggrin protein expression by immunohistochemistry on day 0, day 45 and day 90, according to the protocol established by the Veterinary Pathology Service based on the methodology described by HSU *et al*, (1981). The immunohistochemical technique was performed from frozen tissue sections (cuts) preserved in Tissue Teck (Sakura, New Jersey, EUA). The primary antibodies used were anti-rabbit polyclonal Filaggrin Code Bs-6327-R (Bioss, Boston, EUA) 1:25, anti-rabbit polyclonal Anti-IL4 Code AB9622 (ABCAM, San Francisco, EUA ) 1:600, anti-rabbit polyclonal Anti-IL31 Code ab102750 (ABCAM, San Francisco EUA) 1:100, anti-rabbit polyclonal Anti-IL6 Code PAA079Ca1 (Cloude Clone, Houston, EUA) 1:300, anti-rabbit polyclonal Anti-IL10 CodPAA056Ca01 (Cloude Clone, Houston, EUA) 1:400, anti-rabbit polyclonal Anti-TNF-alpha Code AB6671 (ABCAM, San Francisco, EUA) 1:600. Samples with primary antibodies were stored in a refrigerator at  $4-8^\circ\text{C}$  for a period of eighteen hours. After this time, the secondary antibody was added (Envision – Dako Bytomatic, California, EUA), and after washing with deionized water was installed diaminobenzidine chromogen - DAB (Dako Cytomatic, California, EUA) for 1 minute and

immediately washed with deionized water to stop the reaction. Finally, the blades were underwent hematoxylin staining as a counterstain.

### **Serum cytokine dosage – ELISA**

Systemic inflammatory response was assessed by measuring serum cytokine concentrations IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 and TNF $\alpha$  using quantitative trading kits Nori® Canine ELISA Kit DataSheet (Genorise, Philadelphia, PA, USA) and cytokine IFN-gamma using the Quantitative Trading Kit RayBio® Canine IFN-gamma ELISA Kit (Raybiotech, Norcross, GA, USA) following manufacturers recommendations. The sensitivity of each test was 10 pg/mL para a IL6, 7 pg/mL to TNF-alfa, 5.8pg/ml to IL-10, 0,5 pg/ml to IL-11, 18 pg/ml to IL17, 12 pg/ml to IL31a, 0 pg/ml to IL4 and 0,1 ng/ml to IFN-gama. The readings were performed on the Stat Fax Reader model 2100 (Awareness Technology, Salerno, Italy) and the calculations in the program MultiCalc.

### **Epidermal Lipid Staining**

For epidermal lipid staining, Sudam RED was used as established by Salvador (2014). After thawing the sections (cuts) were washed in alcohol at 70°C. Then they were stained by Sudam III - Scarlet R staining for 45 minutes and washed again in 70°C alcohol and water for three to four minutes. Subsequently, they were stained with Harris hematoxylin for three minutes and washed in water for five minutes. Then the samples remained in the acid alcohol differentiator for 5 to 10 minutes, washed in water for 5 minutes and finally mounted in aqueous medium (Aquatex®, Merck, Germany).

### **Statistical Analysis**

The immunohistochemistry quantification and the degree of inflammatory infiltrate were performed by the semi-quantitative method of labeled cell distribution score through double-blind analysis of two evaluators. The ratio between the amount of positive cells and total cells in the whole section (cut) was evaluated. The scoring system followed the one described by Barbosa (2015), namely: score 0: no marking on cells; 1: 1 to 25% positive cells; 2: 26 to 50% cell marked; 3: 51-75% of marked cells and 4 > 76% of marked cells. Epidermal lipids were evaluated semi-quantitatively and rated on a scale ranging from 0 to 3, with: 0 absence of lipid material, 1: light lipid content, 2: moderate lipid content, 3: intense lipid content.

The distribution of all variables was evaluated with graphical analysis (QQ Plot and Histogram) and normality tests (Shapiro-Wilk). Friedman's test followed by Dunns was used to compare the medians of the variables obtained during the treatment days. Spearman's test was used to correlate each variable with each other. The percentage reduction in pruritus and CADESI scores on days 60 and 90 was calculated, and the T-test for one variable was used to verify whether the mean of such percentages differed from the hypothetical value of 50%. An alpha level of 0.05 was used. The tests were performed using Statistical Analysis Software - SAS version 9.3 (SAS Institute, 2011) and software Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, 2007).

Serum cytokine dosage data were expressed as mean and standard deviation. All comparisons between moments were made using the variance analysis technique for the repeated measures model in independent groups, complemented by Bonferroni's multiple comparisons test, when the variable adhered to the normal probability distribution and, in the absence of this probability Dunn's multiple comparison test was applied. Data were considered significant when  $p < 0.05$ . All graphs were performed with GraphPad prism 5.1 Software.

## Results

The 6 study animals included the following breeds: Pug, Poodle, German Shepherd, Labrador, Lhasa Apso and a mongrel dog. No sexual distinction was seen between the animals, most of the animals were young adults, only two senile and all had chronic disease for more than 12 months.

The application of mesenchymal stem cells proved to be easy to perform. Among the animals studied, only one presented apathy in the first and second application of MSC, and in the third application showed more pronounced effects such as salivation, imbalance, lethargy and trismus. These effects were temporary and did not require drug intervention to return to normality. The other animals showed no side effects during mesenchymal stem cell applications.

Laboratory tests such as blood count, biochemistry and urine tests showed no significant changes between the different moments of the study, and no changes in these parameters were attributed to MSC. There was no statistical difference between the different moments of observation of these parameters throughout the study.

Throughout the placebo treatment it was possible to see an increase in pVAS and CADESI-4 in most animals, followed by a progressive decrease of these parameters from the start of cAd-MSCs treatment (day 45) until its completion (day 90). Significant differences between the median pVAS and the CADESI-4 score were found between the start of MSC treatment (day 45) compared to the end of this treatment (day 90) as shown in Table 1. Figure 1 illustrates the pVAS and the individual CADESI score of the animals throughout the study, while Figure 2 simultaneously shows a reduction in the pruritus and CADESI-4 medians of all atopic dermatitis animals at all-time points study observation.

The percentage reduction in pruritus between end of placebo treatment (Day 45) and end of MSC treatment (Day 90) was greater than 50% ( $p = 0.0029$ ), with VSA reducing by an average of 9 (extremely severe pruritus) to 2.83 (very mild pruritus), with pruritus reduction ranging from 55.6 to 77.8% among the studied animals.

The CADESI-4 lesion score also showed a significant mean reduction of greater than 50% between the end of placebo treatment and the end of MSC treatment ( $p = 0.0022$ ). The score decreased from 65 (severe atopic dermatitis) to 19.66 (mild atopic dermatitis), with an average reduction among animals ranging from 58.7% to 85.7%. Only two animals reduced the score to a score lower than 10, considered as disease remission (Table 2). The clinical course between starting placebo treatment (Day 0) and ending stem cell treatment (Day 90) is illustrated in Figure 2.

The expression pattern of Th2-type inflammatory cytokines (IL4, IL6, IL31) of Th1-type (TNF-alpha), Treg (IL10), filaggrin protein by immunohistochemistry technique and epidermal lipids by Sudam Red staining did not show significant differences between the different evaluation moments: Day 0, Day 45, Day 90 (Table 3). It was also not possible to observe significant correlations between the expression of these markers at any time of the study.

Dosages of serum concentrations of IL1, IL4, IL6, IL10, IL17, IL31, IFN-gama, TNF-alpha by ELISA, did not show significant differences ( $p > 0,05$ ) none of the times evaluated during placebo and stem cell treatment (Table 4).

The Spearman correlation test used to verify the presence of correlation between the degree of inflammatory infiltrate and the scores obtained from cytokines and filaggrin in their respective sections, showed a positive correlation only for TNF-alpha cytokine. Correlation coefficient values and p value are shown in the table below (Table 5).

## Discussion

With the stem cell treatment protocol established in this study, it was possible to observe an evident clinical improvement in all dogs. There was a tendency to increase in CADESI-4 score and pVSA from the beginning to the end of the placebo treatment, followed by a decrease in these parameters from the beginning to the end of the MSC treatment. Significant differences in pVSA and CADESI-4 score were evidenced between the beginning and the end of MSC treatment. It is important to highlight that although the study group is composed of a small number of dogs, the study was longitudinal, randomized, double-blind, placebo-controlled, in which all included animals had atopic dermatitis for more than 12 months of evolution; they were refractory to current treatments and did not use any other therapy to influence the results obtained.

It is also noteworthy that the reduction in VSA and CADESI-4 observed in the study animals was significantly greater than 50% ( $p = 0.0029$  and  $p = 0.0022$ ) respectively from the beginning to the end of the MSC treatment. The animals went from extremely severe pruritus at the end of placebo treatment (grade 9) to very mild (grade 2.83) at the end of cell therapy, and went from the classification of severe atopic dermatitis (grade 65) to mild atopic dermatitis (grade 19.66)<sup>24</sup>. According to the indications currently used to evaluate success in therapy, based on a reduction of two centimeters or less in pVSA, and a 50% reduction in the CADESI lesion score<sup>29-30</sup>, cell therapy can be considered a successful modality in canine atopic dermatitis, leading to a reduction of almost 6 cm in the pruritus scale and a significant reduction of more than 50% of the lesion score. The adoption of these efficacy assessment criteria takes into account the possibility of seasonal fluctuations in the clinical manifestations of atopic dermatitis, with alternation of periods of improvement and worsening, avoiding the placebo effect, while taking into account the fact that treatments act to control symptoms, since atopic dermatitis is a chronic, multifactorial and complex disease. Thus, the results obtained in our study cannot be attributed to seasonal variations in the clinical manifestations of the disease.

The use of stem cells in the treatment of inflammatory and degenerative diseases in medicine and veterinary medicine is still incipient. The beneficial therapeutic effects observed in our study are in agreement with the small

number of reports evaluating the treatment of atopic dermatitis in veterinary medicine and medicine<sup>21-35</sup>.

In our study, all animals showed satisfactory clinical improvement, adopting a protocol consisting of three stem cell applications at biweekly intervals. The biweekly interval between applications was inferred as the minimum interval to obtain apparent clinical improvement of symptoms from the observation of a previous pilot study<sup>31</sup>, without, however, prolonging the study time too much. In this previous pilot study there was no observation of consistent clinical improvement in dogs treated with single application of autologous adipose tissue-derived MSCs; for this reason, the author suggests that sequential applications of MSCs were necessary to maximize the immunomodulatory effects of MSCs and thus obtain better clinical results. The author attributes the failure of this work to the protocol used regarding the number of applications, dose used, and route of application. For this reason it was adopted in our study sequential applications in a total of three.

Recently, a study<sup>32</sup> covering 26 dogs with atopic dermatitis also observed clinical improvement with significant reduction in CADESI- score and pruritus scale, with remission of the disease for six months with a single application of adipose tissue-derived heterologous MCT at the dose of  $1,5 \times 10^6$  cells per animal, lower than the dose used in the present study which was  $5 \times 10^6$  per animal.

Cell therapy studies for dogs with AD are still incipient and it is unknown which protocol regarding dose, route and number of applications, and site of origin of stem cells results in the best therapeutic effects. It is still uncertain whether sequential stem cell applications result in a longer lasting effect. Our study lasted 45 days and it was not possible to conclude if sequential applications would have a longer lasting effect than the six months of remission obtained in the single application study. However, through subsequent telephone contact with owners, the perpetuation of therapeutic effects for up to one year has been reported. Notwithstanding the encouraging results, it is noteworthy that cell therapy, as well as other therapies for atopic dermatitis, may result in failures<sup>31</sup>.

In medicine, a clinical study<sup>33</sup> conducted with a human patient with atopic dermatitis observed a dose-dependent therapeutic effect of stem cells. Patients receiving a higher dose of stem cells ( $5 \times 10^7$  versus  $2.5 \times 10^7$ ) showed a 50% improvement in severity index and eczema area; a 33% decrease in the investigator's overall assessment score and a 50% decrease in the atopic dermatitis severity score and a 58% reduction in pruritus, with IgE levels and number of peripheral eosinophils decreasing during the study. It is noteworthy that in this study the MSC were obtained from the umbilical cord and the route of application was subcutaneous, which points to a new field of research in veterinary medicine, in order to evaluate whether the stem cell site of origin, the route of application and differences in the doses employed may result in different therapeutic effects.

Stem cell application was easy to perform and to apply, with few side effects. In fact, side effects are reported as rare in both medicine and veterinary medicine. Unlike other authors, this study showed transient side effects in an animal. The reason why one of the animals had side effects is still uncertain. It is believed that this may be due to hypersensitivity of this animal to the remnant of DMSO, a component used in the preservation of stem cells that may have

remained during the washing process of MSCs during its preparation; there are reports of possible reactions to DMSO in medicine. Another possibility is that the animal is hypersensitive to fetal bovine serum, a component used in cell washing solutions<sup>38</sup>. All hematological, biochemical and urinalysis parameters did not show significant changes between the beginning and the end of the study, in agreement with another study<sup>32</sup>, which also did not show significant changes in hematological and serum biochemistry parameters at any time of observation over the six months of this study.

Although a significant improvement was observed in the animals treated with stem cells regarding clinical aspects, it was not possible to observe alteration of the cutaneous and systemic inflammatory response during the treatment with placebo and with stem cells. No significant differences were observed between the pattern of cutaneous cytokine expression by the immunohistochemistry technique and the ELISA serum cytokine measurements during the study, which can be attributed to some factors: skin fragment collection site for the immunohistochemistry technique, although it is known that the non-lesional skin of atopic dogs also presents alterations differing from healthy skin; sensitivity of the techniques employed to detect subtle changes; the moment of evaluation of the animals that presented the chronic phase of the disease, being many of the studied cytokines to be of type Th2, associated with the acute phase of the disease; and, finally, inherent variability characteristics of cytokines that present dynamic release by immune cells and short half-lives. Finally, the small number of studies evaluating the effect of immunomodulatory treatments on the systemic or cutaneous inflammatory response in dogs with atopic dermatitis makes it difficult to make comparisons and to justify these findings.

Similar to our study, another study<sup>39</sup> evaluating the efficacy of oral immunomodulatory treatment in atopic dogs, comparing clinical signs by CADESI-3 and proinflammatory cytokine profile by RT-PCR - did not detect changes in the expression pattern of cytokine mRNA between atopic dogs receiving immunomodulator treatment and atopic dogs receiving placebo. Although clinical improvement was evident in the immunomodulator-treated group, this finding was attributed to the complexity of cytokine dynamics during the different stages of disease progression, or that perhaps longer immunomodulation may be necessary to observe significant differences in cytokine dynamics pattern of cytokine and skin barrier expression, leading to clinical improvement.

Although the anatomical site and the degree of inflammation may be considered as factors that may influence the expression pattern of the studied cytokines and filaggrin, in this study, only the positive correlation between the degree of inflammatory infiltrate and cytokine TNF-alpha expression was observed.

Although no changes in the cutaneous and systemic inflammatory response were observed by the studied cytokines, it is known that the mechanism of action of stem cells is wide, and the clinical improvement observed in animals with atopic dermatitis can be attributed to the other anti-inflammatory properties and immunomodulatory stem cells, such as: decreased proliferation, maturation and activities of dendritic cells<sup>17,19</sup>; decreased activation and proliferation of T<sup>17,20</sup> cells; decreased production of other inflammatory mediators such as iNOS, eNOs, INFC, NOX4<sup>34</sup>; decreased mast cell

degranulation<sup>35</sup>; decreased B lymphocyte proliferation and IgE<sup>36</sup> production; increased TGF-beta and PGE2<sup>36</sup>.

No changes in the skin barrier were also detected with MSC treatment, and no significant changes were observed in the expression pattern of filaggrin protein or epidermal lipids during placebo and MSCs treatment. Due to the anti-inflammatory and immunosuppressive properties of stem cells, an improvement in the inflammatory skin pattern was expected, with consequent increase in expression of filaggrin protein and increase in epidermal lipids. This is because in atopic dermatitis in dogs, it is believed that skin barrier changes may be secondary to the inflammatory process, due to the epigenetic influence on filaggrin production and the imbalance between lipid synthesis and catabolism enzymes, filaggrin and dyskeratinization.<sup>40-45</sup> Thus, the absence of observation of alterations in the cutaneous and systemic inflammatory response justifies the absence of alteration in the skin barrier in our study. However, there is a lack of studies on the effects of systemic immunomodulatory treatments on the skin barrier of dogs with atopic dermatitis, and it is unknown whether systemic treatments are effectively capable of improving the lipid layer and expression of filaggrin protein and how long this effect, if existing could be observed.

## Conclusion

Treatment with cAd-MSCs with the protocol used was beneficial for the improvement of clinical manifestations in animals with atopic dermatitis, significantly decreasing the CADESI-4 and VSA score. The clinical improvement evident in AD animals treated with cell therapy, coupled with the low frequency of side effects, indicates that cAd-MSCs can be considered as a very promising therapeutic modality in the future for the treatment of canine atopic dermatitis.

## Figures

Figure 1: The pVAS and the CADESI-4 individual score of the animals throughout the study

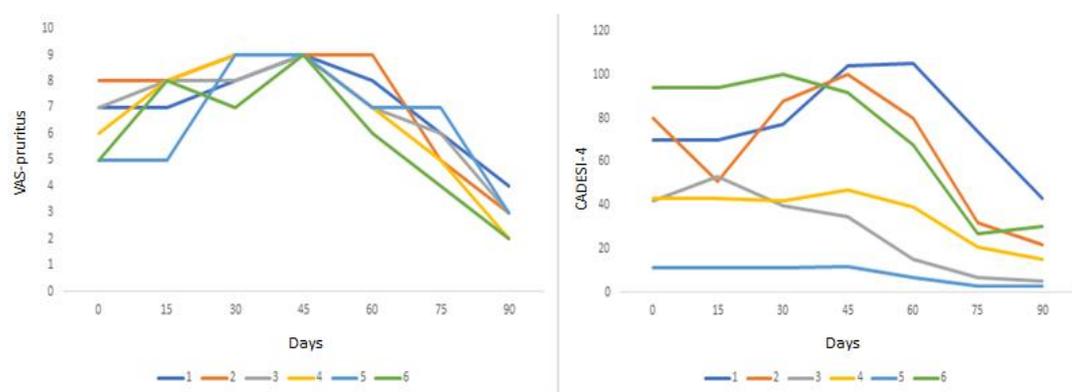


Figure 2: Median of the owners assessed visual analog scale (VAS) scores of pruritus (VSA) and assessed canine AD extent and severity index (CADESI-4) of animals with atopic dermatitis throughout the study.

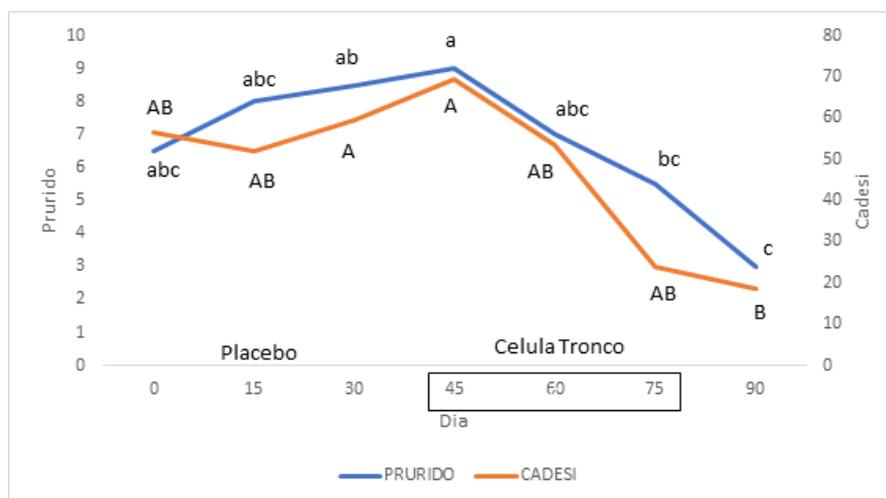


Figure 3: Clinical evolution of some animals studied between Day 0 (start of placebo treatment) and Day 90 (end of stem cell treatment).



## Tables

Table 1: Median (Min - Max) of the owners assessed visual analog scale (VAS) scores of pruritus and CADESI-4 clinicians assessed canine AD extent and severity index scores throughout the study.

Day	PLACEBO treatment			cAd-MSCs treatment			
	0	15	30	45	60	75	90
<b>VASp</b>	6,5 (5-8) <sup>abc</sup>	8 (5-8) <sup>abc</sup>	8,5 (7-9) <sup>ab</sup>	9 (9-9) <sup>a</sup>	7 (6-9) <sup>abc</sup>	5,5 (4-7) <sup>bc</sup>	3 (2-4) <sup>c</sup>
<b>CADESI-4</b>	56,5 (11-94) <sup>AB</sup>	52 (11-94) <sup>AB</sup>	59,5 (11-100) <sup>A</sup>	69,5 (12-104) <sup>A</sup>	53,5 (7-105) <sup>AB</sup>	24 (3-74) <sup>AB</sup>	18,5 (3-43) <sup>B</sup>

Table 2: Percentage reduction for VSAp and CADESI-4 scores of atopic dermatitis animals at end of placebo treatment (Day 45) and at the end of MSCs treatment (Day 90).

Dogs	VSAp			CADESI-4		
	Day 45	Day 90	Reduction (%)	Day 45	Day 90	Reduction (%)
1	9	4	55,6	104	43	58,7
2	9	3	66,7	100	22	78
3	9	3	66,7	35	5	85,7
4	9	2	77,8	47	15	68,1
5	9	3	66,7	12	3	75
6	9	2	77,8	92	30	67,4
<b>Average</b>	9	2,83	68,5	65	19,6	72,1

Table 3: Analysis of the distribution of expression scores of cytokines, filaggrin protein and epidermal lipids between: Day 0, Day 45, Day 90 by Fisher's method.

Parameters	IL4	IL6	IL10	IL31	TNF-alpha	Filaggrinn	Epidermal Lipids
<i>Value p</i>	0,1873	1,000	0,5958	0,3629	0,8625	0,7960	0,1773

Table 4: Multiple comparisons between all-time points of placebo and stem cell treatment without statistical significance ( $p > 0.05$ ) of serum cytokine dosages by the ELISA method.

Cytokines	Placebo treatment			cAd-MSCs treatment			
	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60	Dia 70	Dia 90
IL-1	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
IL-4	33,58	31,25	<31,25	<31,25	<31,25	<31,25	<31,25
IL-6	<50	<50	<50	<50	51,3	57	53,9
IL-10	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
IL-17	<94	<94	<94	<94	<94	<94	<94
IL-31	68,1	73,6	65,8	77,5	66,6	62,8	71
TNf-alfa	0,15	0,25	0,25	0,30	0,25	0,25	0,30
IFN-g	81	82,7	89,8	75,5	66,7	90,7	64,2

Table 5: Spearman correlation between the degree of inflammatory infiltrate and cytokine and filaggrin scores in their respective section tissues.

Parameter	Correlation coefficient	Value p
Filaggrin	-0,09	0,72
IL4	0,11	0,69
IL6	0,37	0,13
IL10	0,32	0,20
IL31	0,41	0,10
TNF alfa	0,80	0,0001

## Referecences

1. Gedeon, N.K.Y.; Mueller, R. S. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clinical and Translational Allergy*, 2018, 8:41.
2. Olivry, T.; Deboer, D.J.; Griffin, C.E *et al.* The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2001, 81:143-146.
3. Miller, W.H.; Griffin, E.C.; Campbel, K.L. Small Animal Dermatology, 7 edition. Saint Loius: Elsevier Mosby, 2013.
4. Marsella, R.; De benedetto, A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Vet Science*, 2017, 4:3.
5. Halliwell,R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2006, 114 (3-4):207-208.
6. Wilhen, S.; Kovalik, M.; Favrot, C. Breed-associate phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2010, 22:143-149.
7. Pucheu-haston C.M.; Bizikova, P.; Marsella *et al.* Review: lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2015, 26:124- e32.
8. Nuttall, T.J.; Knight, P.A.; Mcaleese *et al.* T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2002, 87(3-4): 379-384.
9. Schlotter, Y.; Rutten, V.P.M.G.; Rieners *et al.* Lesional skin in atopic dogs showed a mixed type-1 and type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2011,143:20-26.
10. Mora, F.; Fuente, C.; Jasmin, P. *et al.* 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. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2007, 115: 223–229.
11. Olivry, T.; Dean, G.A.; Tompkins, M.B. *et al.* Toward a canine model of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experim Dermatol*,1999, 8:204-211.

12. Gonzales, A.J.; Humphrey, W.R.; Messamore, J.E *et al.* Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2013, 24(1):48-53.
13. Santoro, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: an Update. *Vet Clinics of Clinical Small Animal*, 2019, 49: 9-26, 2019.
14. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA *et al.* Treatment of Canine Atopic Dermatitis: 2015 Updated Guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *Vet Research*, 2015; 11:210.
15. Hillier, A. Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Vet Medic*, 2002, 97(3):210-224.
16. GRIFFIN, C.E.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol and Immunopathol*, 2001, 81:363 – 383.
17. Rasmusson, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experim Cell Research*, 2006, 312:2169-2179.
18. Webster, R.A.; Blaber, S.P.; Herbert, B.R *et al.* The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics – a review. *New Zealand Vet Journal*, 2012, 60(5): 265-272.
19. H AM, Dow SW. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells*, 2016, 34(7):1709-1729.
20. Gugjoo, M.B.; Amarpal, A.; Sharma, GT. Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of Cell Phisiol*, 2019, 1-33.
21. Aggarwal, A., Pittender, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses *Blood*, 2015, 105:1815-1822.
22. Duffy, M.M.; Ritter, T.; Ceredig *et al.* Mesenchymal stem cells effects on t-cell effector pathways, 2011, 2(34):1-9.
23. Leibacher, J.; Henschler, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem cells Research Therap*, 2016, 7(7):1-12.
24. Favrot, C.; Steffan, J.; Seewald, W *et al.* A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol*, 2010, 21: 23-31.
25. Olivry, T.; Saridomichelakis, M.; Nuttall, T *et al.* Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol*, 2014, 25:77–e25.
26. Rybníček, J. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol*, 2008, 20:115-122.
27. Hill, P.B.; Lo, A.; Eden, CA *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in a small animal in general practice. *Vet Records*, 2006, 158(16):533-539.
28. Griffin, CE.; Deboer, DJ: The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 81(3-4):255-269.
29. Cosgrove, S.B; Wren, J.A.; Cleaver, D.M *et al.* A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunol*, 2013, 117(6):587-e142.

30. Souza, C.P.; Rosychuk, R.A.; Contreras, E.T *et al.* A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dog in the western USA. *Vet Dermatol*, 2018, 29(6):489 – e164.
31. Hall, M.N., Rosenkrantz, W.S., Hong, J.H. *et al.* Evaluation of the potential use of adiposed-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Therapeutics*, 2010, 11(2):E1-E14.
32. Villatoro, A.J.; Prieto-hermida, M.; Fernandez, V. *et al.* Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Vet Records*, 2018, 183: 1-7.
33. Kim, H.S.; Lee, J.H; Roh, K.H. *et al.* Clinical Trial of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells for the Treatment of Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: Phase I/IIa Studies. *Stem Cells*, 2017, 35(1):248-245.
34. Jee, M.K.; Im, Y.B.; Choi, J.I *et al.* Compensation of cATSCs-derived TGFb1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. *Cell Death and Disease*, 2013, 4:497.
35. Kim, H.S.; Yun, J.W.; Shin, T.H. *et al.* Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- $\beta$ 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. *Tissue Specific Stem Cells*, 2015, 33:1254-1266.
36. Shin, T.H.; Lee, B.C.; Choi, S.W. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis via regulation of B lymphocyte maturation. *Oncotarget*, 2017, 3( 8):512-522.
37. Shin, T.H.; Kim, H.S.; Choi, S.W. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. *International Journal of Molec Science*, 2017, 25(18): E244.
38. Cox, M.A.; Kastrup, J.; Hrubisko, M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell Tissue Bank*, 2012, 13 (2):203-215.
39. White AG, Santoro D, Ahrens K, Marsella R. Single blinded, randomized, placebo-controlled study on the effects of ciclosporin on cutaneous barrier function and immunological response in atopic beagles. *Vet Immunol Immunopathol*, 2018;197(February):93–101.
40. Marsella, R.; Samuelson, D.; Harrington, L. Evaluation of filaggrin expression in sensitized atopic Beagles and in normal controls before and after allergen exposure. *Vet Dermatol*, 2009, 20:547-554.
41. Marsella, R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? *Vet Dermatol*, 2013, 24:266-e59.
42. Marsella, R.; Olivry, T.; Carlotti, D.N. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2011, 22:239-248.
43. Marsella, R.; Samuelson, D.; Doerr, K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 2010, 21:81-88.

44. Marsella, R., Nicklin, C., Lopez, J. Studies on the routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol*, 2006, 17:306-312.
45. Chermprapai, S.; Broere, F.; Gooris, G. *et al.* Altered lipid properties of the stratum corneum in canine atopic dermatitis. *Biomembranes*, 2018, 1860: 526-533.

## 9. ARTIGO CIENTÍFICO II

Artigo Científico a ser enviado para a revista “Ciência Rural”. Site da Revista:

<http://coral.ufsm.br/ccr/cienciarural/> ISSN Eletrônico: 1678-4596

As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link:

<http://coral.ufsm.br/ccr/cienciarural/normas.htm>

Aplicações do uso de células-tronco na Dermatologia

Stem cells in Dermatology

Camila Domingues de Oliveira

Luiz Henrique Araújo Machado

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -  
Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – Rua Prof. Doutor Walter  
Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR. 18618-681.

Correspondência Oliveira CD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita  
Filho”.

Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR.  
18618-681. Phone: (+55) 14 3880-2043. E-mail: camiladominguesvet@gmail.com

Resumo

O uso das células-tronco em dermatologia parece ser promissor tendo em vista o caráter imunomediado e inflamatório de muitas dermatopatias e o potencial regenerativo das células-tronco na reparação de feridas. As células-tronco mesenquimais apresentam

potente ação anti-inflamatória e imunomoduladora, são células imunoevasivas, viabilizando seu uso terapêutico, permitindo que seja utilizada inclusive de forma heteróloga. Na dermatologia apresenta vasto potencial de uso no tratamento de feridas, alopecias, fístula perianal, dermatite atópica, doenças autoimunes e de ordem genética. Ao contrário do que ocorre em medicina, as pesquisas com células-tronco nas dermatopatias em medicina veterinária ainda é incipiente, de forma que esta revisão tem como objetivo vislumbrar o potencial terapêutico das células-tronco na dermatologia veterinária de forma a encorajar a realização de novas pesquisas com o uso de células-tronco no tratamento das dermatopatias.

Palavras-chave: dermatopatias, células-tronco, terapia celular, doenças imunomediadas, pele, inflamação, imunomodulação.

Abstract:

The use of stem cells in dermatology is promissor taking in account the immuno and inflammatory character of many dermatopaties and the healing potential of the stem cell in the recovery wounds. The mesenchymal stem cells shows potents immunomodulatory and antiinflammatory action, are imunoevasives, enabling the therapeutic use allowing the use in heterologue form. In the dermatology field it representes large potencial of use in the healing wounds, treatment of alopecias, fistula perineal, atopic disease, autoimmune and genetic diseases. In the oposite way of humam medicine researches in veterinary dermatology with stem cellas are still incipiente, so that this review has the objective to glimpse all therapeutic potential of stem cells dermatology and encourage the development of new researches in the treatment of dermatopathies in veterinary.

Key words: stem cell, cell therapy, autoimmune diseases, skin , inflammation, immunomodulation

### Introdução

O uso das células-tronco em dermatologia parece ser promissor tendo em vista o caráter imunomediado e inflamatório de muitas dermatopatias e o potencial regenerativo das células-tronco na reparação de feridas. Embora ainda incipiente, pesquisas *in vitro*, em modelos animais e alguns ensaios pré-clínicos e clínicos têm empregado o uso de células-tronco em diversas condições clínicas dermatológicas com respostas favoráveis e segurança. As células-tronco são consideradas como possíveis opções terapêuticas em se tratando medicina preventiva, que visa mudar o destino de um indivíduo, evitando o aparecimento de uma condição clínica, com aumento da expectativa de vida, e na medicina regenerativa, curando doenças que a medicina moderna ainda não é capaz de curar. Esta revisão tem como o objetivo vislumbrar o potencial terapêutico das células-tronco na dermatologia veterinária de forma a encorajar a realização de novas pesquisas com o uso de células-tronco no tratamento das dermatopatias (HARMAN, 2013; KHOSROTEHRANI, 2013, PRODINGER et al., 2017).

As células-troncos são células indiferenciadas presentes em distintos órgãos do organismo, participam do processo fisiológico de reparação celular dos tecidos de mamíferos. São dotadas de capacidade de regeneração pelo processo de divisão celular, mesmo após longos períodos em inatividade. Além da capacidade de regeneração, as células-tronco podem se diferenciar em um tecido ou órgão específico com funções especializadas como: músculo, ossos, células hematopoiéticas ou nervosas. Estas características peculiares distinguem as células-troncos de qualquer outro tipo celular (WEBSTER et al.; 2013; HARMAN et al., 2013; GUGJOO, et al., 2019).

As células-tronco podem ser de origem embrionárias ou de tecidos adultos. Embora as célula-tronco de origem embrionária tenham maior capacidade de diferenciação (plasticidade), seu uso é associado ao risco de mutações, formação de tumores, além do envolvimento de questões éticas e morais que desencorajam o seu uso (RASMUSSEN, 2006; AMARIGLIO et al., 2009; WEBSTER et al., 2010). Já as células-tronco de tecidos adultos, apresentam menor plasticidade, entretanto, não são associadas com questões éticas, formações de tumores e são obtidas facilmente de tecidos adultos, o que viabiliza o seu uso terapêutico. As células tronco-adultos podem ser hematopoiéticas, obtidas a partir do estroma da medula óssea ou sangue do cordão umbilical, ou mesenquimais (CTM), quando oriundas do tecido adiposo, ósseo, muscular e da parede do cordão umbilical (HARMAN et al., 2013; WEBSTER et al., 2010; GUGJOO, et al. 2019; QUIMBY, 2019).

As CTM constituem uma população heterogênea de tipos celulares e apresentam pequenas diferenças em sua morfologia, capacidade proliferativa e diferenciação dependendo de seu tecido de origem. Por isso, para serem consideradas CTM, a International Society Cellular Therapy (ISCT) estabeleceu critérios de padronização, de forma que para serem consideradas CTM, estas células devem apresentar certas características como: aderência ao plástico em culturas celulares, expressão de marcadores de membrana como: CD73, CD105, CD 90, ausência de CD14, CD34, CD45, CD11b, CD79A, HLA-DR, e serem capazes de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (RASMUSSEN, 2006; HARMAN, 2013; TAEHOON et al, 2103, AGGARWAL & PITTENDER, 2015).

As CTM são células consideradas imunoevasivas, pois não expressam MHC classe II, não expressam moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, CD86, expressam minimamente moléculas de MHC classe I, o que as torna não imunogênicas,

conseguindo evadir da resposta imunológica. Estas características das CTM viabilizam seu uso terapêutico, permitindo que seja utilizada inclusive de forma heteróloga, ou seja, em indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente distintos (RASMUSSEN, 2006, AGGARWAL & PITTENDER, 2015).

Além da capacidade de regeneração e diferenciação as células-tronco são conhecidas por possuírem ação antifibrótica, angiogênica, antiapoptótica, potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, sendo estas ações consideradas como mais relevantes para o seu uso terapêutica em diversas condições clínicas (RASMUSSEN, 2006, HARMAN, 2013, LI et al. 2013, AGGARWAL & PITTENDER, 2015, KIM et al., 2017).

As CTM exercem sua ação anti-inflamatória e imunossupressora através de distintos mecanismos, possuem tropismo para sítios inflamados, e através da sua potente atividade secretória (ação parácrina) as células-tronco alteram o microambiente local em que se incorporam, orquestrando o processo de imunomodulação através de várias ações (DUFFY, et. al., 2011, AGGARWAL & PITTENDER, 2015).

As CTM são capazes de interagir com o sistema imune inato e adaptativo e são associadas à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes, como: fator de necrose tumoral, interleucina 1a, 1b, IL12, IFN-gama, diminuição da maturação, proliferação e a atividade das células apresentadoras de antígenos, diminuem a proliferação e atividade de linfocitária e plasmócitos, aumentam a população de linfócitos reguladores, com aumento de citocinas com efeito anti-inflamatório como a IL10. Todas estas ações são mediadas tanto pelo contato direto célula a célula como pela secreção parácrina de diversos mediadores imunoregulatórios (AGGARWAL &

PITTENGER, 2005; RASMUSSEN, 2006; DUFFY, et al., 2011; LELBACHER, & HENSCHLER, 2016, CHOW et al, 2017; SHIN et al.; 2017).

Devidos suas propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e imunomodulatórias, pela sua capacidade de imunoevasão, segurança e efetividade, as CTM têm sido utilizados na clínica médica há mais de 10 anos. Em medicina veterinária, o uso autólogo das CTM originárias de tecido adiposo iniciou-se em 2003 e desde então numerosos trabalhos têm sido conduzidos em equinos e caninos com mínimos efeitos sistêmicos e adversos. Inicialmente, os estudos focavam nos efeitos regenerativos das células-tronco, entretanto, a observação de seus efeitos: imunossupressor, imunoregulatório e anti-inflamatório, ampliou seu estudo no tratamento de doenças crônicas inflamatórias e degenerativas (WEBSTER et al., 2010; HARMAN, 2013, KIM et al., 2017, GUGJOO, et al., 2019) à semelhança do que ocorre em medicina, onde as células-tronco são empregadas para tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes refratárias a tratamentos convencionais como de diversas doenças autoimune e imunomediadas incluindo doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD), lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla, psoríase e diabetes tipo I com resultados benéficos (DUFFY et al., 2011, KIM & CHO, 2013, KIM et al., 2017; SHIN, et al., 2017).

O tecido cutâneo, por ser um órgão de constante renovação e sujeito a diversos tipos de injúrias, também apresentam células-tronco responsáveis pela sua homeostasia, sendo reconhecidos até o momento pelo menos cinco diferentes tipos de células-tronco cutâneas habitando em nichos específicos, distribuídas na cama basal da epiderme, na protuberância dos folículos pilosos (células tronco foliculares e da crista neural), nas glândulas sebáceas, nas papilas epidérmicas e na derme, que mediante determinados

estímulos e injúrias são capazes de se multiplicar, de interagir entre si, mantendo a integridade do tecido cutâneo. As células-tronco presentes na derme, e na hipoderme são, contudo, de origem mesenquimal, e estão associadas intimamente a vasos sanguíneos, originando fibroblastos e miofibroblastos diante de injúrias, participando ativamente de processos de reparação tecidual (MONTEIRO, 2012, PRODINGER et al., 2017, OWCZARCZYK-SACZONE et. al., 2018).

A descoberta de células-tronco na pele, em especial em medicina humana, abre um vasto campo de pesquisa e utilização destas células, quer de forma autóloga ou heteróloga na cicatrização de feridas, enxertos cutâneos, manejo terapêutico das alopecias, além da possibilidade de reprogramação genética das células somáticas da epiderme em células pluripotentes, as quais podem se diferenciar em qualquer outro tecido, podendo ser utilizadas no tratamento de diversas doenças, o que é bastante promissor, visto que células epidérmicas podem ser facilmente obtidas, e com menor possibilidade de rejeição quando do seu emprego autólogo (MONTEIRO, 2012, PRODINGER et al., 2017).

#### *As Células-tronco no manejo de feridas cutâneas*

O tratamento de feridas crônicas na dermatologia humana é considerado um importante tópico, tendo em vista o fato de cerca de 50% das feridas crônicas, que por queimaduras, acidentes, doenças metabólicas, não responderem aos tratamentos atuais disponíveis. Embora em medicina veterinária, não se tenha dados epidemiológicos concretos sobre a relevância das feridas cutâneas em animais, em muitos casos, principalmente os de ordem traumática, onde há extensa perdas cutâneas, a cicatrização de feridas por ora é bastante desafiador (KIM, et. al. 2016).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que requer a coordenação da migração, proliferação e diferenciação celular, formação de matriz extracelular, produção de fatores de crescimento, proteínas e angiogênese necessária para o suporte vascular. Os três passos necessários para a cicatrização de uma ferida envolvem uma fase inflamatória, com recrutamento de neutrófilos e macrófagos, a formação de um tecido de granulação envolvendo miofibroblastos, angiogênese e reepitalização e, finalmente, a remodelação tecidual, onde os fibroblastos da derme adjacente invadem o tecido cicatricial e reorganizam as fibras colágenas (HARMAN, 2013; KIM et. al. 2013, KIM, et. al. 2016).

As células-tronco têm a habilidade de migrar para áreas inflamadas, interagir com o microambiente local, diminuindo a produção de citocinas inflamatórias deletérias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias, produzem uma série de fatores de crescimento como FGF ( fator de crescimento hepatoide), KGF ( fator de crescimento dos queratinócitos), GM-CSF ( fator de crescimento de colônias granulocíticas), IGF1 entre outros, que promovem a epitelização, organizam a matriz extracelular contribuindo para a cicatrização de uma ferida crônica. Em estudo com modelos murinos, as células-tronco humanas derivadas de adipócitos aumentaram a proliferação e migração de fibroblastos diminuindo o tempo para o fechamento de feridas. Outros estudos em murinos mostraram que CTM aplicadas quer por via endovenosa, tópica ou subcutânea melhoram a cicatrização. As CTM podem melhorar a aderência de enxertos e facilitam a regeneração cutânea em feridas agudas e crônicas (HARMAN, 2013; KIM et. al. 2013)

Pela capacidade regenerativa das células-tronco, é possível através da engenharia tecidual a criação de um novo tecido cutâneo a partir de biomateriais sintéticos substitutos de pele para produzir um enxerto cutâneo em casos de queimaduras, traumas e feridas por vasculopatias, com a vantagem de se utilizar células do próprio indivíduo e com isso evitar problemas de rejeição. Pesquisas têm sido realizadas para solucionar a

vascularização e viabilidade destes enxertos e acredita-se que no futuro breve eles possam vir a ser utilizados trazendo uma revolução nos casos de lesões extensas de pele com maior índice de recuperação e menor índice de rejeição ( HARMAN, 2013, KIM et. al, 2013, LI et. al., 2013).

Dentre os fatores de crescimento produzidos pelas células-tronco, cita-se o fator de crescimento hepatoide, o qual é naturalmente produzido pelos fibroblastos e inibe que a formação de cicatrizes. Este fator é interessante em especial em medicina humana, onde o uso de células-tronco em cirurgias plásticas pode inibir ou remodelar o tecido cicatricial quando usadas isoladamente ou associadas a um enxerto de tecido adiposo. Em pacientes com fibrose, a infusão de CTM pode modular a atividade das metaloproteinases e diminuir a produção de colágeno e fibrose, que é interessante em se tratando de queloides (KIM et.al., 2019)

Um estudo com 10 cães, no qual se utilizou células-tronco alogênicas via intradérmica no tratamento de feridas induzidas, observou-se melhor taxa de cicatrização das ferida, com melhor índice de proliferação celular, síntese de colágeno, angiogênese e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e menor produção de fatores de cicatrização como metaloproteinases e fator de crescimento de fibroblastos (HARMAN, 2013, KIM et. al., 2013)

#### *Células-tronco e manejo das alopecias*

As alopecias é uma importante condição clínica na dermatologia humana e veterinária, são classificadas como inflamatórias, não inflamatórias e ainda como cicatriciais e não cicatriciais em medicina humana. Algumas alopecias cicatriciais em medicina, como por exemplo o líquen plano pilar, são causadas por um processo inflamatório de linfócitos TCD8+ que provocam depleção das células-tronco na

protuberância (bulge) folicular. Já na alopecia areata, o processo inflamatório é direcionado para a região da papila dérmica, sem acometimento do bulge folicular, o que pode explicar a repilação de áreas de alopecia areata muitos anos após o início da doença. Na alopecia androgênica, os andrógenos inibem a sinalização para diferenciação das células foliculares do bulge folicular. Em um estudo em pacientes com alopecia androgenética, foi aplicado uma dose única injetável de fatores estimuladores das células-tronco do bulge folicular, com melhora clínica por até um ano após a aplicação. Acredita-se que as células-tronco mesenquimais possam promover a repilação pela produção de diversos fatores de crescimento folicular, por estimular e prolongar a fase de anágeno, e suprimir inflamação e os sinais de apoptose das células foliculares (HARMAN, 2013, OWCZARCZYK-SACZONE et. al., 2018, GENTILE & GARCOVICH, 2019). Estes efeitos favoráveis das células-tronco no manejo das alopecias, que agora estão sendo investigados em medicina, podem no futuro vir a ser empregados na dermatologia veterinária no manejo de alopecias inflamatórias em cães como alopecia areata e alopecias não inflamatórias como displasias foliculares e alopecia X, que semelhantemente a alopecia androgênica humana, acredita-se estar associada com possíveis alterações hormonais a nível folicular, acarretando aprisionamento dos folículos na fase telógena ( MILLER, GRIFFIN, CAMPBEL, 2013).

#### *Células-tronco e tratamento de fístula perianal*

A fístula perineal é uma doença crônica inflamatória, que acomete principalmente cães adultos da raça Pastor Alemão, na qual tratos fistulosos de difícil tratamento são formados na região perineal. Quanto a etiopatogenia, fístula perianal é associada a uma resposta inadequada do sistema imunológico diante das bactérias da própria microbiota local (MILLER, GRIFFIN, CAMPBEL, 2013). Um estudo piloto, investigou a eficácia e a segurança de células-tronco autólogas derivadas da medula óssea em seis cães com

resposta parcial ao tratamento convencional com ciclosporina oral. Nestes animais, foi mantido o uso da ciclosporina na dose habitual e associado o tratamento subcutâneo com células-tronco para acelerar ou otimizar a ação da ciclosporina. Os animais do estudo receberam, sob sedação, uma aplicação única subcutânea de 20 milhões de células-tronco adjacente as glândulas, sendo em seguida seladas com fibrina. Após três meses, todos os cães se recuperaram da fístula e após 6 meses apenas dois cães apresentavam recidiva com a presença de uma fístula pequena. A dose da ciclosporina pode ser reduzida nestes animais de 8,22mg/kg para meses 3,59mg/kg ao final de 6 meses. A aplicação das células tronco demonstrou ser segura e ser uma alternativa como terapia coadjuvante no tratamento da fístula perineal (FERRER et al., 2015). Em humanos estudos demonstraram que pacientes com doença de Crohn com fístulas crônicas podem ser beneficiados com o uso de células-tronco tanto por aplicação local quanto sistêmica (KIM & CHO, 2013, HOFFMAN & DOW, 2016).

#### *Células-tronco no tratamento da síndrome hepatocutânea*

A síndrome hepatocutânea, também conhecida como necrose epidérmica metabólica, é uma condição clínica associada principalmente com hepatopatia vacuolar e tumores produtores de glucagon, acarretando hipoaminoacidemia acentuada com consequente necrose da epiderme. É uma doença que ocasiona hiperqueratose grave de coxins com crostas, fissuras, levando muitas vezes à impotência funcional dos membros. Além do acometimento dos coxins, as regiões de protuberâncias ósseas e muco-cutâneas apresentam-se com hiperqueratose, crostas bem aderidas sobre uma base eritematosa por ora erodida. Apresenta mau prognóstico, com grande parte dos animais evoluindo a óbito meses após o diagnóstico (MILLER, GRIFFIN, CAMPBELL, 2013). Recentemente, um trabalho utilizando infusões regulares de células-tronco derivadas de tecido adiposo associado ao tratamento convencional foi associado com melhora dos sintomas clínicos

e aumento do tempo de sobrevivência do animal, que se estendeu por 30 meses após diagnóstico, tempo de sobrevivência considerado incomum, com o autor atribuindo o aumento da sobrevivência do animal ao uso associado das células-tronco no tratamento (NAM, et. al., 2017). De fato, estudos relatam o potencial do uso de células-tronco autólogas derivadas do tecido adiposo no manejo de hepatopatias agudas e crônicas, com aumento de sobrevivência dos pacientes hepatopatas, devido às ações das células tronco, como: regenerativas, pela produção de vários fatores tróficos estimulantes de hepatócitos, ação anti-inflamatórias e imunotolerância, ação antioxidantes e antiapoptóticas, diminuindo a morte de hepatócitos e mantendo sua função, angiogênicas, antifibróticas, diminuindo a fibrose e remodelação tecidual das células-tronco (KIM & CHO, 2013, HU ZHAO, LI, 2019).

#### *Células-tronco no tratamento da dermatite atópica*

A dermatite atópica é uma doença de ordem genética, inflamatória, pruriginosa e crônica, onde os tratamentos empregados são utilizados para o controle dos sintomas da doença e melhorar a qualidade de vida dos animais acometidos. Embora haja muitos recursos terapêuticos, alguns animais podem ser refratários a estes tratamentos ou apresentar efeitos colaterais que inviabilizam estes tratamentos (MILLER, GRIFFIN, CAMPBELL, 2013).

Até o momento em medicina veterinária, existe um diminuto número de estudos avaliando a ação das CTM na dermatite atópica. Um estudo clínico (piloto, aberto, não-controlado, não-blindado) avaliou o efeito de uma única aplicação, de célula-tronco mesenquimais autólogas originária de tecido adiposo, na dose de 1,3 milhões de células por quilo de peso, via endovenosa em cinco cães atópicos. Neste estudo, foi observada diminuição significativa do escore de prurido e melhora não significativa do CADESI

com duas a três semanas após a aplicação, seguido de piora progressiva até a 10 e 12 semana, quando o e prurido retornou ao estágio inicial. Não foi relatado efeitos colaterais em nenhum dos animais (HALL et al., 2010).

Jee et. al, (2013), observou melhora clínica dos sintomas de dermatite atópica em cães sensibilizados com *Dermatophagoides farinae*, após a aplicação tópica, por três dias consecutivos, com extrato de células-tronco mesenquimais. Nestes animais foi observado aumento da secreção de citocinas imunossupressoras como a IL10 e TGF-beta, diminuição da infiltração da epiderme por linfócitos TCD3 e TCD4 e inibição de citocinas pró inflamatórias, como: IL6, INFC, iNOS, eNOS e Nox4.

Recentemente, um estudo avaliando o uso de uma aplicação única, endovenosa, na dose de 1,5 milhões de células-tronco heterólogas derivadas de tecido adiposo por quilo de peso, em 26 animais com DA recalcitrante, observou melhora significativa do prurido em uma semana e do CADESI-4 em quatro semanas, que se perpetuou após 6 meses do final do estudo, não sendo relatados efeitos colaterais e alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos (VILLATORO et al., 2018).

Em medicina, Kim et al., (2017) realizou um estudo envolvendo 34 pacientes humanos com dermatite atópica que receberam uma única aplicação subcutânea, de células-tronco heterólogas oriundas de cordão umbilical em diferentes doses, e observou efeito terapêutico dose-dependente das células tronco. Pacientes humanos que receberam uma dose maior de células-tronco ( $5 \times 10^7$  versus  $2,5 \times 10^7$ ), apresentaram uma melhora de 50% no índice de gravidade e área de eczema, uma diminuição de 33% no escore de avaliação global do investigador e uma diminuição de 50% no escore de gravidade da dermatite atópica e redução do prurido em 58%, com o níveis de IgE e número de eosinófilos periféricos diminuindo durante o estudo.

#### *Células-tronco e Vitiligo*

O vitiligo é distúrbio idiopático adquirido que se caracteriza pela destruição seletiva de melanócitos epidérmicos funcionais. Os mecanismos pelos quais os melanócitos são destruídos ainda não são totalmente identificados e envolve fatores genéticos e não genéticos e imunomediados. O vitiligo afeta de 0,5% a 2% da população em geral em todo o mundo, sem preferência por sexo ou etnia. O distúrbio é caracterizado por manchas circunscritas despigmentadas que variam em número e tamanho. O vitiligo é uma condição incomum que também ocorre em animais sendo relatados em caninos, equinos e felinos. Dentre os cães as raças mais acometidas são Dobermann Pinscher, Rotweiller, Pastor Alemão e Pastor Belga, além da leucodermia, também acarreta leucotriquia e leuconiquia (MILLER, GRIFFIN, CAMPBELL, 2013). O tratamento do vitiligo é difícil e longo, apesar dos tratamentos disponíveis em medicina humana como a fototerapia e fotoquimioterapia sistêmica, a doença pode progredir com repigmentação incompleta, dependendo da área afetada. Em animais desconhece-se até o momento o emprego de terapias para o vitiligo, até mesmo pelo fato de o vitiligo em animais ser considerado como uma dermatopatia meramente estética, não apresentando outras repercussões do âmbito emocional como em medicina humana. Em medicina humana, tem-se o relato do uso de três aplicações sequenciais de células-tronco de origem folicular autóloga em paciente com vitiligo com boa diminuição na densidade da área afetada pelo vitiligo, com excepcional padrão de repigmentação, parecendo um tratamento bastante promissor em pacientes com vitiligo (VARASCHIN et al. 2017).

#### *Célula-tronco e doenças imunomediadas*

As doenças autoimunes resultam de uma resposta inapropriada do sistema imunológico, com perda da imunotolerância e desenvolvimento de autoreatividade, levando a quadros clínicos com alta mortalidade e morbidade (VANIKAAR et. al., 2017).

As células-tronco têm sido empregadas no tratamento de dermatopatias imunomediadas e inflamatórias refratárias a terapias convencionais, como doença do enxerto versus hospedeiro, pênfigo vulgar, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose generalizada, psoríase, pênfigo foliáceo (VANIKAR et. al., 2017, KIM & CHO, 2013, PRODINGER et. al. 2017, SHIN, et. al., 2017, WANG, et. al, 2019). Em medicina, células-tronco derivadas do cordão umbilical e medula-óssea, parecem ser eficazes mesmo quando aplicadas por diferentes vias como endoflébica, local ou tópica. Em um estudo com psoríase vulgar moderada a grave paciente manteve a doença em remissão por 5 anos após uma única aplicação de células-tronco, outro paciente que recebeu três infusões semanais de células-tronco derivadas da parede do cordão umbilical, e duas aplicações nos três meses posteriores manteve a doença em remissão por quatro anos. Em um outro estudo, o uso de células-tronco no tratamento da psoríase vulgar foi apresentou melhores resultados do que com o tratamento convencional com metotrexato. O uso de células-tronco em paciente com lúpus foi capaz de melhorar os sintomas clínicos e melhorar a função dos órgãos afetados (KIM & CHO, 2013, SHIN, et. al., 2017). O uso de células-tronco autólogas derivadas da medula óssea no tratamento de pênfigo foliáceo em 11 pacientes humanos refratários a terapias convencionais, obteve remissão da doença por um período de 80 meses em 75% dos pacientes tratados, sendo observado efeitos colaterais como pirexia, alergia, infecção, com somente um paciente evoluindo a óbito com falência múltipla de órgãos dois meses após ao transplantes de células-tronco (WANG, et. al., 2017).

Pela não observação de efeito colaterais, as células tronco parecem ser seguras e aplicáveis para o tratamento de doenças imunomediadas graves refratárias, a medida que mais estudo sejam realizados e que o uso de células-tronco estejam bem fundamentados, no futuro as células-tronco podem vir a ser utilizadas como tratamento de primeira

escolha, visto a menor possibilidade de efeitos colaterais e manutenção de efeitos terapêuticos mais duradouros (KIM & CHO, 2013).

#### *Células-tronco e doenças genéticas*

Células-tronco têm sido investigadas em pacientes no tratamento de doenças genéticas como por exemplo a distrofia recessiva, uma rara doença genética bolhosa, na qual os pacientes não apresentam genes que codificam a síntese de colágeno 2, o que acarreta graves complicações como deformidades nas mãos e nos pés, além de cânceres epiteliais agressivos. A infusão local direta ou administração endovenosa de CTM tem demonstrado ser capaz de melhorar a produção do colágeno tipo 2, associadas com a restauração de fibras imaturas de fibrilas e integridade derme epidérmica comparada com pacientes que receberam placebo em modelos murinos. Outro autor descreveu a reposição do colágeno tipo 2 na junção dermo-epidérmica com a administração de células-tronco derivadas de medula-óssea de doadores sadios em feridas crônicas de indivíduos com distrofia recessiva. A administração levou a redução de bolhas e aumento da reepitelização de úlceras crônicas (PRODINGER et. al, 2017). Em cães embora raro, também é reconhecido a ocorrência de dermatopatias de ordem genética como a epidérmolise bolhosa e ictiose, todas com mau prognóstico (MILLER, GRIFFIN, CAMPBEL, 2013). Diante do reconhecimento de que células-tronco podem apresentar respostas favoráveis em pacientes com doenças genéticas em humanos, abre-se um campo de pesquisa para a possibilidade do emprego destas no tratamento de dermatopatias genéticas que ainda carecem de manejo terapêutico efetivo nos animais.

#### *Conclusão*

Diante das propriedades das células-tronco mesenquimais, e dos estudos conduzidos até agora a terapia celular parece ser promissora no tratamento de doenças inflamatórias e imunomediadas, pela sua eficácia e segurança. É, porém, necessário a

realização de mais pesquisas que consolidem o conhecimento do comportamento das células-tronco no manejo terapêutico das distintas doenças, inclusive com a padronização de qual protocolos são mais eficazes quanto a: doses, via de administração, frequência das aplicações e fonte de células-tronco utilizadas. A integração das pesquisas em medicina humana e medicina veterinária, pela semelhança da etiopatogenia de muitas doenças podem acelerar a progressão do conhecimento das células-tronco, no que tange a efetividade, a segurança e aplicabilidade destas células como modalidade de tratamento, de forma que no futuro, estas terapias possam ser transportadas do campo da pesquisa e ser empregadas efetivamente , com uma medicina baseada em evidências clínicas consistentes, na rotina clínica tanto em medicina como na medicina veterinária, trazendo quem sabe cura ou pelo menos um prognóstico melhor em doenças que atualmente, a medicina moderna ainda não é capaz de controlar ou curar (HARMAN, 2013, HOFFMAN & DOW, 2016).

#### *Referências Bibliográficas*

AGGARWAL, A., PITTENDER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2015. Available from: <[http://dx.doi.org /10.1182/blood-2004-04-1559](http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559). Accessed: jul. 18, 2019. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.

DUFFY, M.M.; RITTER, T.; CEREDIG, R.; GRIFFIN, M.D. Mesenchymal stem cells effects on t-cell effector pathways. **Stem cell Research**, v.2, n.4, p. 34, 2011. Available from: <<http://dx.doi.org> Accessed: jun. 16, 2019. doi:

GENTILE, P.; SIMONE, G. Advances in Regenerative Stem Cell Therapy in Androgenic Alopecia and Hair Loss: Wnt Pathway, Growth-Factor, and Mesenchymal Stem Cell Signaling Impact Analysis on Cell Growth and Hair Follicle Development. **Cells**, v. 8, n.

466, p. 1-21, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.3390/cells8050466>. Accessed: ago. 3, 2019. doi: 10.3390/cells8050466.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, Saint Louis, Missouri, 7 ed, 2013.

GUGJOO, MB.; AMARPAL A.; SHARMA, G.T. Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. **Journal Cell Physiology**, p1–33, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28348>. Accessed ago. 10, 2019. doi: [10.1002/jcp.28348](http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28348).

FERRER, L.; LAM, A.; FALK, E. B.; ZEWE, C.; MEOLA, D.; HOFFMAN, T. Treatment of canine perianal fistulas with an intralesional injection of human mesenchymal, embryonic-derived stem cells (hE-MSCs) **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 297–313, 2015. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12252>. Accessed: jul. 19, 2019. doi: 10.1111/vde.12252.

HALL, M.N., ROSENKRANTZ, W.S., HONG, J.H., GRIFFIN, C.E., MENDELSON, C.M. Evaluation of the potential use of adipose-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of canine atopic dermatitis: a pilot study. **Veterinary Therapeutics**, v.11, n.2, p.E1-E14, 2010.

HARMAN, R. J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 90-96, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12000>>. Accessed: agos. 13, 2019. doi: 10.1111/vde.12000.

HU, C.; ZHAO, L.; LI, L. Current understanding of adipose-derived mesenchymal stem cell-based therapies in liver diseases. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 199,

2019. Available from: <<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1310-1>>. Accessed: jul. 13, 2019. Doi: [10.1186/s13287-019-1310-1](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1310-1).

JEE, M.K.; IM, Y.B.; CHOI, J.I.; KANG, S.k. Compensation of cATSCs-derived TGFb1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatites. **Cell Death and Disease**, v.4, p. 497, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/doi/10.1038/cddis.2013.4>. Accessed: mai. 10, 2019. Doi: [10.1038/cddis.2013.4](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.4).

KLINGER, C. Mesenchymal stem cells: a potential therapy for canine atopic dermatitis? **Veterinary Records**, v. 183, n.21, p. 651-653, 2018. Available from: <http://dx.doi.org/doi/10.1136/vr.k4985>. Accessed: agos. 04, 2019. doi: [10.1136/vr.k4985](https://doi.org/10.1136/vr.k4985).

KHOSROTEHRANI, K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 307–310, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/doi/10.1111/exd.12141>>. Accessed: ago, 4, 2019. Doi: [10.1111/exd.12141](https://doi.org/10.1111/exd.12141).

KIM, N.; CHO, S-H. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Korean Journal Internal Medicine**, v. 28, p. 387-402, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.387>. Accessed: jul, 23, 2019. Doi: [10.3904/kjim.2013.28.4.387](https://doi.org/10.3904/kjim.2013.28.4.387).

KIM, K.H.; BLASCO-MORENTE, G.; CUENDE, N.; ARIAS-SANTIAGO, S. Mesenchymal stromal cells: properties and role in management of cutaneous diseases. **Journal European Academy Dermatology Venereology**, v. 31, n.3, p. 414-423, 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13934>. Accessed: jun. 30, 2019. doi:[10.1111/jdv.13934](https://doi.org/10.1111/jdv.13934).

KIM, J. W.; LEE, J.H.; LYOO, Y.S.; JUNG, D.; PARK, H.M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds.

**Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 242–e53, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/vde.1201>. Accessed: ago. 13, 2019. doi: 10.1111/vde.1201.

LELBACHER, J.; HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. **Stem cells Research Therapy**, v.7, p. 7, 2016. [10.1186/s13287-015-0271-2](https://doi.org/10.1186/s13287-015-0271-2)

LI X., HAMADA T., OHATA C., FURUMURA, M., HASHIMOTO T. Potential mesenchymal stem cell therapy for skin diseases. **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 515–516, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1111/exd.12194>>. Accessed: ago. 14, 2019. Doi: 10.1111/exd.12194.

MONTEIRO, M. R. Células-tronco na pele. **Surgical Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 2, p: 1590163, 2012. Available from: ISSN: 1984-5510

OWCZARCZYK-SACZONEK, A.; KRAJEWSKA-WŁODARCZYK, M.; KRUSZEWSKA, A.; BANASIAK, I.; PLACEK, W.; MAKSYMOWICZ, W.; WOJTKIEWICZ, J. Review Article Therapeutic Potential of Stem Cells in Follicle Regeneration. **Stem Cells International**, p. 1-16, 2018, Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/1049641>. Accessed: ago. 23, 2019. Doi: 10.1155/2018/1049641

NAM, A.; HAN, S-M.; GO, DM.; KIM D Y.; SEO, K. W.; YOUN, H. Y. Long-term management with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and conventional treatment in a dog with hepatocutaneous syndrome. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 1514-1519, 2017. Available from: <<https://doi.org/10.1111/jvim.14798>>. Accessed: dez, 05, 2018. doi: 10.1111/jvim.14798.

PRODINGER, C.M.; REICHEL, J.; BAUER, W.J.; LAIMER, M. Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology. *Ann Dermatol* Vol. 29, No. 6, p.667-687, 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142530>. Accessed: ago. 24, 2019. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20142530.

RA, J.C.; KANG, S. K.; SHIN, I. S.; PARK, H.G.; JOO, S.A.; KIM, J. G.; KANG, B.C.; LEE, Y. S.; NAKAMA, S.; PIAO, M.; SOHL, B.; KURTZ, A. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 181, 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-18>. Accessed: ago. 21, 2019. Doi: 10.1186/1479-5876-9-18.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v.312, p. 2169-2179, 2006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.019>. Accessed: ago, 21, 2019. Doi: 10.1016/j.yexcr.2006.03.019.

SHIN, T.H.; KIM, H.S.; CHOI, S.W.; KANG, K.S. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. **International Journal of Molecular Science**, v. 25, n. 18, p. E244, 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020244>. Accessed: jul, 12, 2017. Doi: 10.3390/ijms18020244.

VANIKAR, A.V.; MODI, P.R.; PATEL, R.D.; KANODIA, K.V.; SHAH, V.R.; TRIVEDI, V.B. Hematopoietic stem cell transplantation in autoimmune diseases: The Ahmedabad experience. **Transplant Proceedings**, v. 39, p. 703-708, 2007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.070>. Accessed: ago. 12, 2019. Doi: [10.1016/j.transproceed.2007.01.070](http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.070).

VARASCHIN, F.Z.; AYOUB, C.A.; IEZER, N.F.; DI LUCIANO, M. E. T. Padrão de repigmentação em um paciente com vitiligo após a utilização de células tronco. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v.9, n.3, p. 269-274, 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201793923>. Accessed: ago. 10, 2019. Doi: 10.5935/scd1984-8773.201793923.

VILLATORO, A.J.; PRIETO-HERMIDA, M.; FERNANDEZ, V.; FARINAS, F.; ALCOHOLADO, C.; RODRIGUEZ- GARCIA, M.IS.; MARINAS- PARDO, L.; BECERRA, J. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. **Veterinary Records**, v. 183, p. 1-7, 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.104867>. Accessed: abr. 02, 2019. Doi: 10.1136/vr.104867.

WANG, M.; CAO, C.; SUN, J.; PENG, X.; LIU, Q.; HUANG, L.; CHAI, Y.; LAI, K.; CHEN, P.; , LIU, Q.; PENG, Y.; XIONG, H.; ZHANG, J.; CHEN, M.; ZENG, K. Application of autologous hematopoietic stem cell transplantation for pemphigus. **Internal Journal Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 296-301, 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ijd.13461>. Accessed: ago. 10, 2019. Doi: 10.1111/ijd.13461.

WEBSTER, R.A.; BLABER, S.P.; HERBERT, B.R.; WILKINS, M. R.; VESEY, G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics – a review. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 60, n. 5, 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2012.683377>. Accessed: mai. 05, 2019. Doi: 10.1080/00480169.2012.683377.

**ANEXO I** - Dados do padrão de expressão das citocinas inflamatórias, da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica com seu respectivo grau de infiltrado inflamatório e dados do escore de coloração dos lipídeos epidérmicos pela técnica de Sudam Red no Dia 0, Dia 45 e Dia 90 dos animais com dermatite atópica incluídos no estudo

IA		II	TNF- alfa	II	IL-10	II	IL- 6	II	IL- 4	II	IL-31	II	Fil	LE
A1	D0	3	2	3	4	3	4	2	1	3	2	1	1	1
	D45	3	1	3	0	3	2	2	1	3	2	2	1	2
	D90	3	3	3	2	2	0	2	0	3	2	3	2	0
A2	D0	2	0	3	3	2	0	2	0	2	0	3	1	1
	D45	3	2	3	2	2	2	2	1	2	1	2	0	2
	D90	2	1	2	0	2	2	2	2	2	1	3	1	0
A3	D0	2	0	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	0
	D45	1	0	2	0	1	1	2	1	1	2	2	4	1
	D90	1	0	1	1	2	4	1	1	1	1	1	4	0
A4	D0	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	2	3	1
	D45	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	D90	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	2
A5	D0	2	1	1	1	1	3	1	0	1	0	1	0	2
	D45	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	D90	2	0	1	1	1	2	1	0	1	0	1	4	3
A6	D0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
	D45	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
	D90	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	0

Legenda:  
 IA – Identificação do animal  
 A1: animal 1; A2: animal 2; A3: animal 3; A4: animal 4; A5: animal 5; A6: animal 6  
 II – Infiltrado Inflamatório  
 Fil – proteína filagrina  
 LE – lipídeos epidérmicos  
 Escore do Infiltrado Inflamatório, do padrão de expressão das citocinas e da proteína filagrina pela técnica de imunistoquímica: 0 – ausente; 1 – 1 a 25%; 2 – 26 a 50%; 3 – 51 a 75%; 4 - > 76%  
 Escore de coloração dos lipídeos epidérmicos: 0 – ausente; 1 – leve ; 2 – moderado ; 3 – intenso

## ANEXO II – FOTOS DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

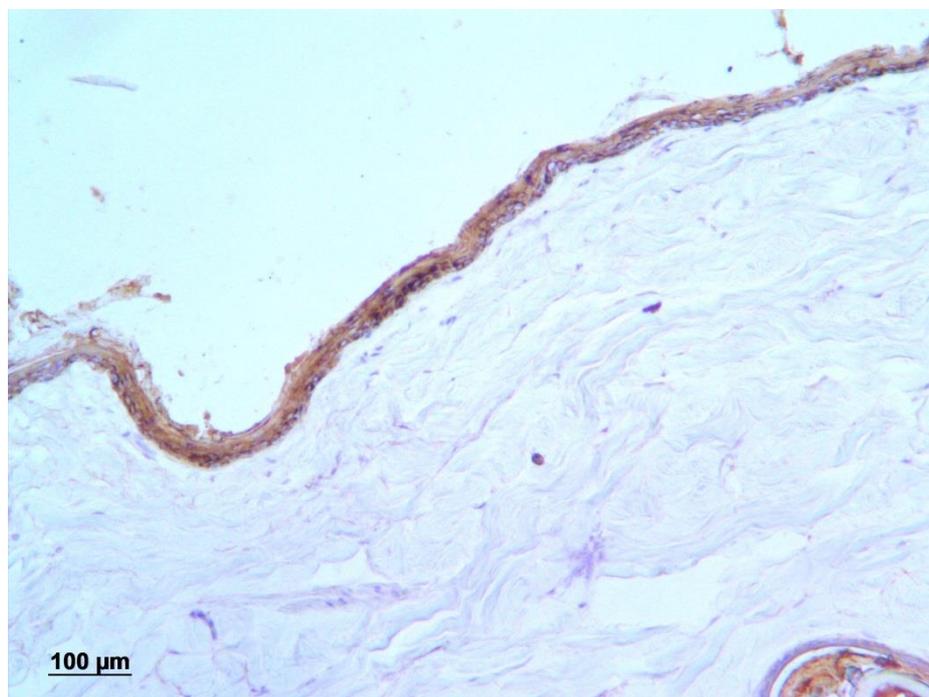


Figura 11 - Corte histológico cutâneo evidenciando marcação com filagrina pela técnica de imuno-histoquímica. Escore 4 (Objetiva 10x).

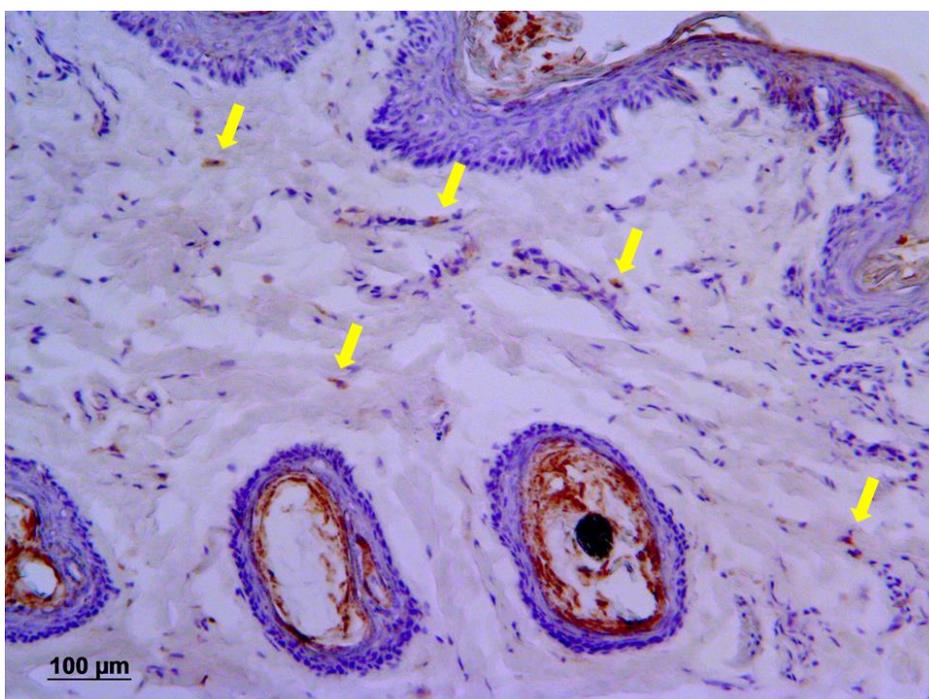


Figura 12 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL4 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).

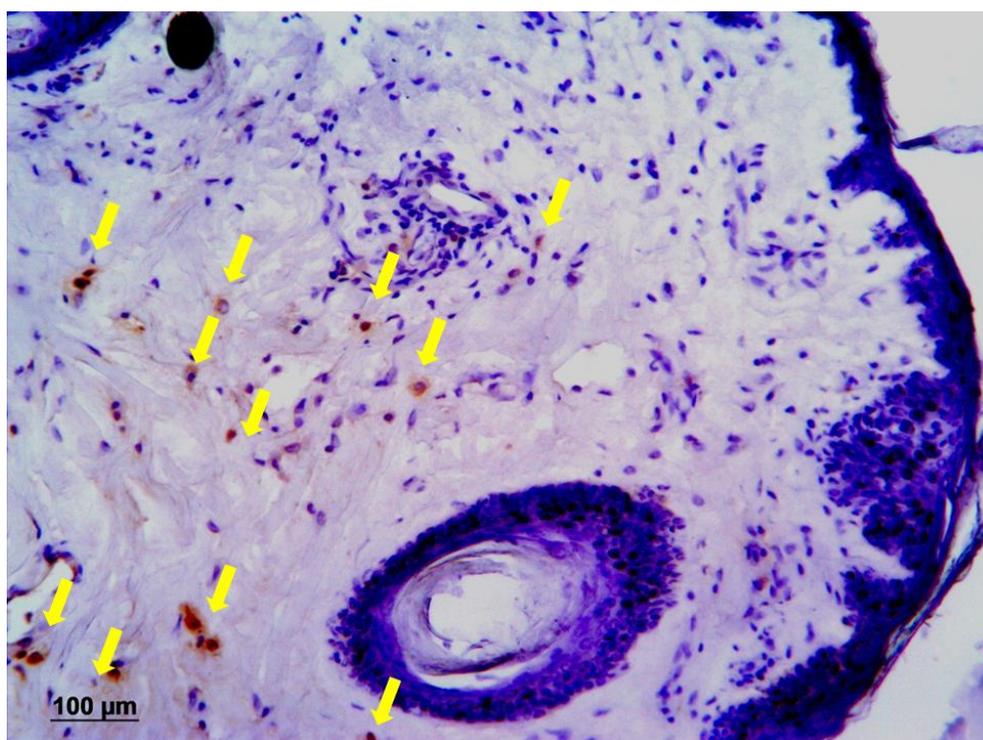


Figura 13 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL6 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).

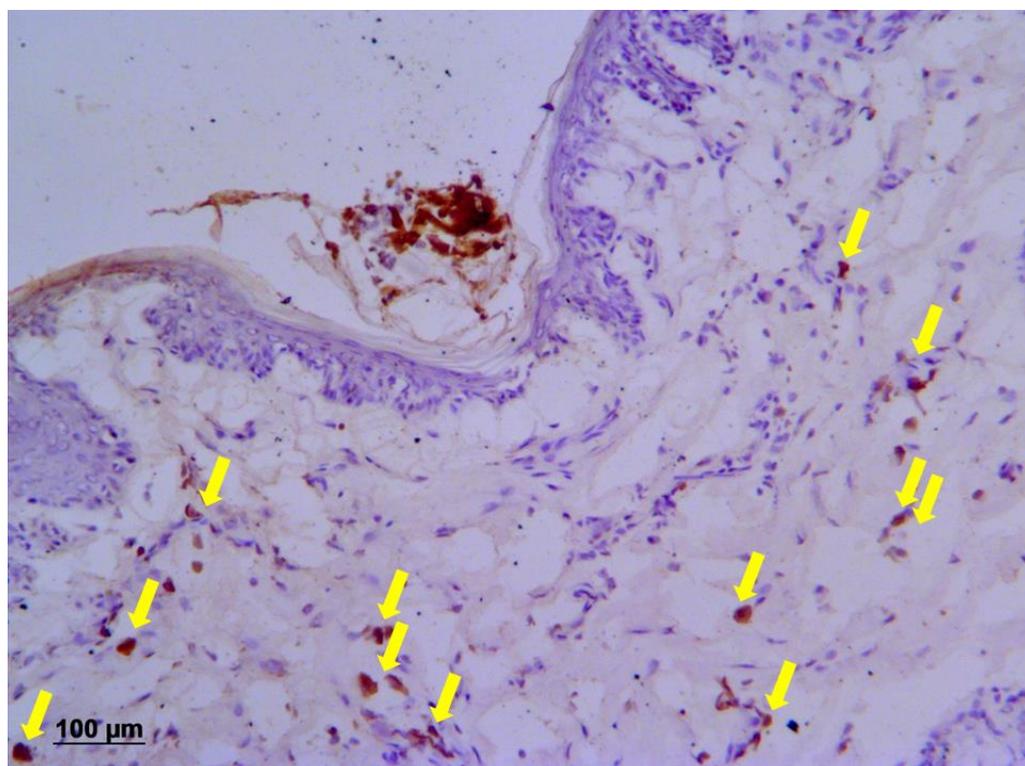


Figura 14 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL10 (setas amarelas). Escore 1 (Objetiva de 10x).

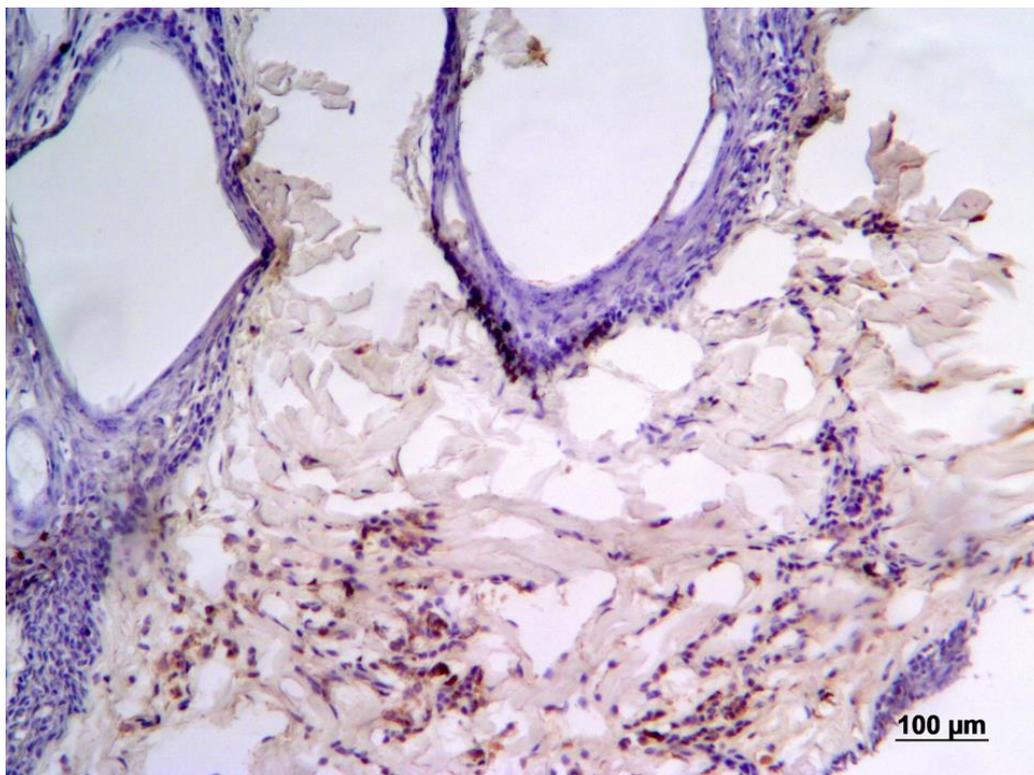


Figura 15 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-istoquímica para citocina IL31. Escore 2 (Objetiva de 10x).

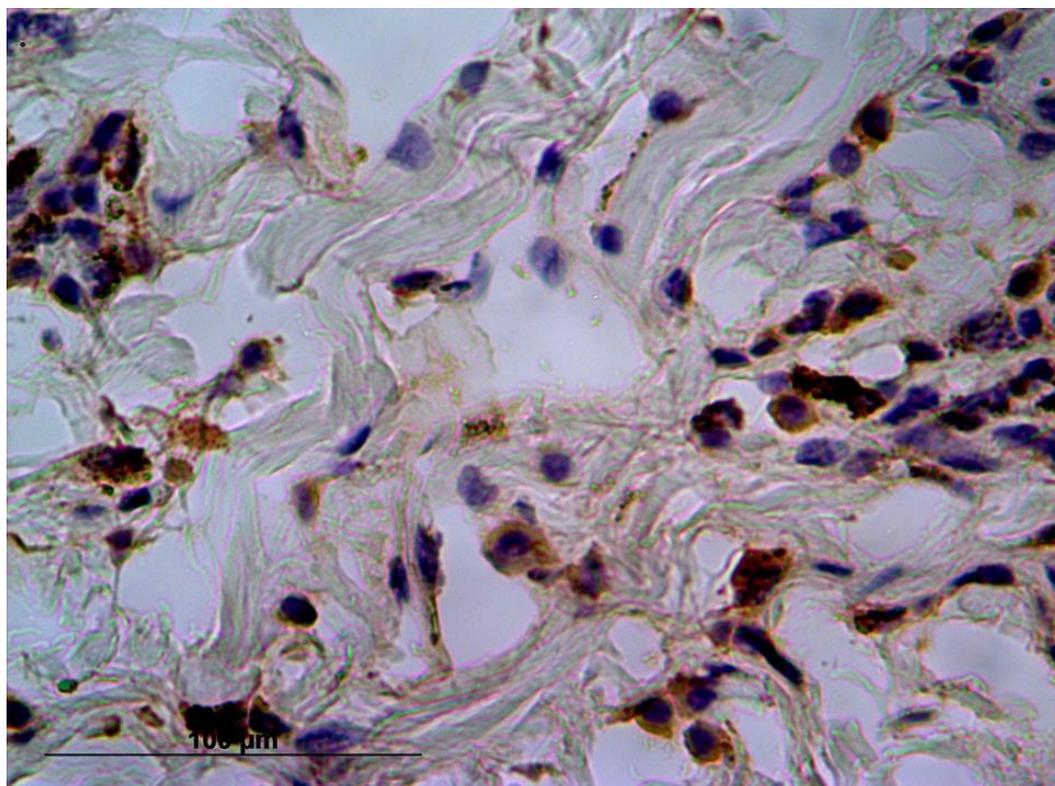


Figura 16 - Corte histológico cutâneo com marcação imuno-histoquímica para citocina IL31. Escore 2 (Objetiva de 40x).

### ANEXO III – FOTOS DA COLORAÇÃO DOS LIPÍDEOS EPIDÉRMICOS

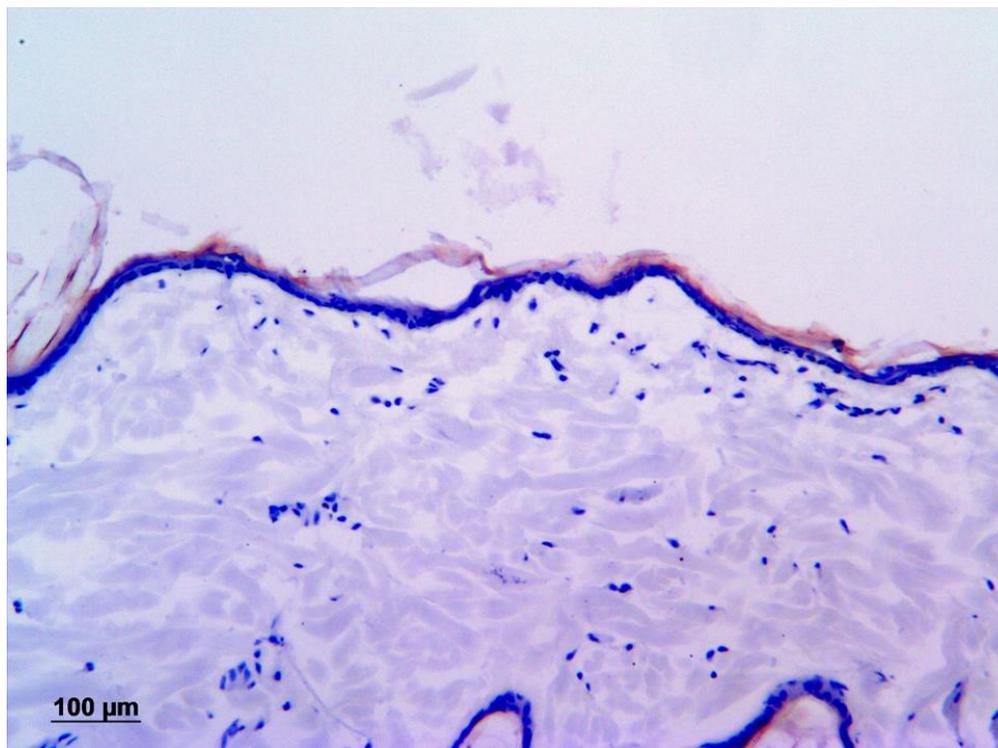


Figura 17 - Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudan Red. Escore 1 (Objetiva de 10x).

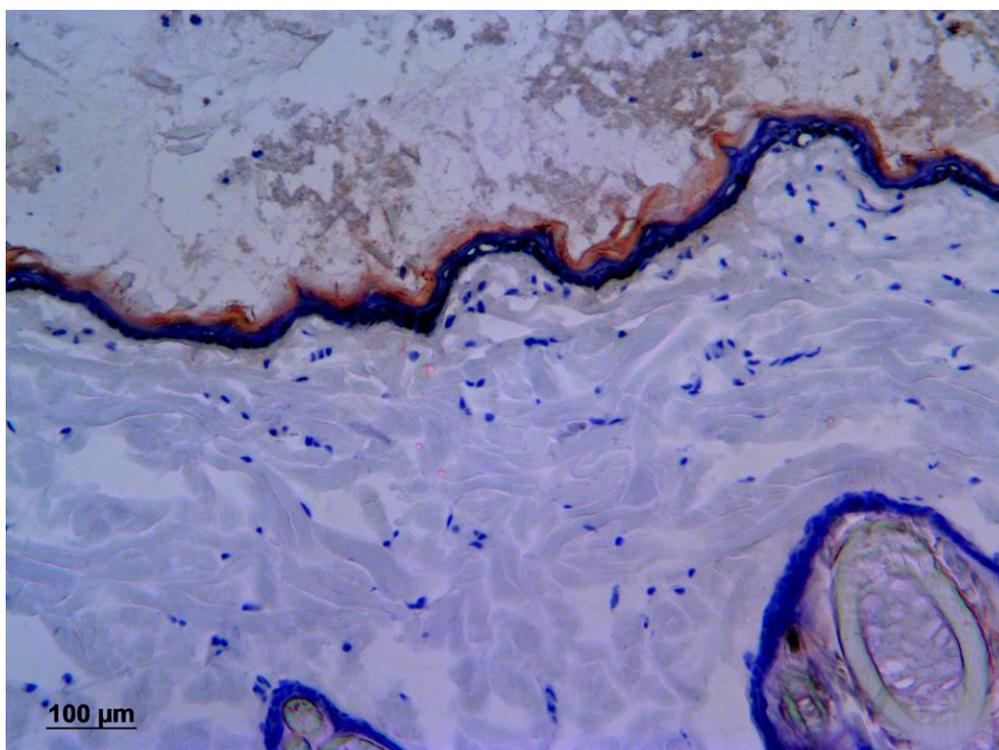


Figura 18 - Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudan Red. Escore 2 (Objetiva de 10x).

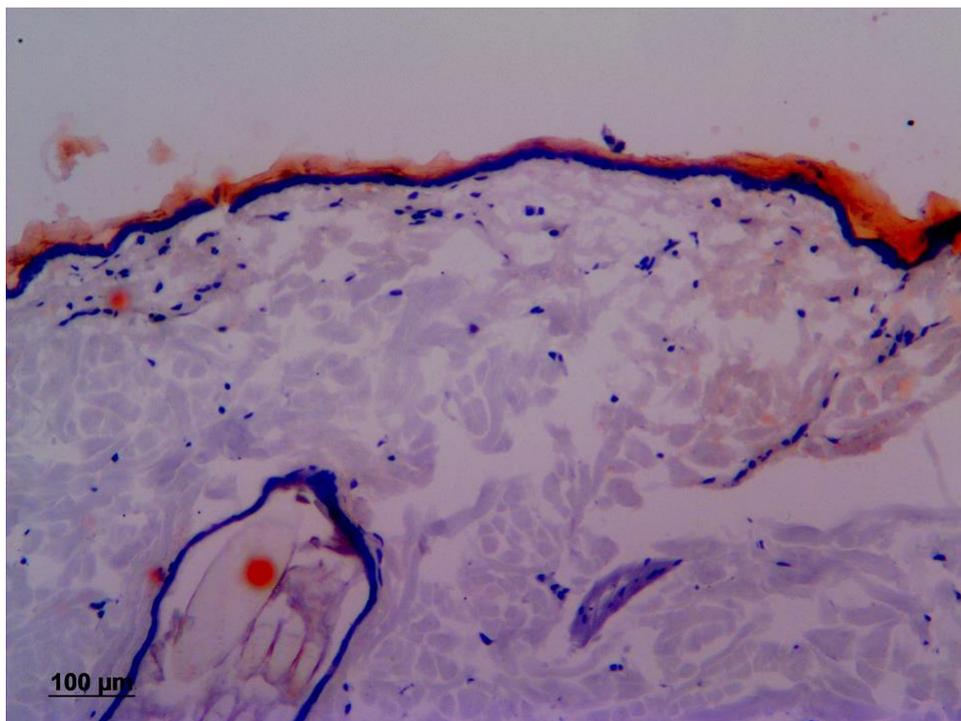


Figura 19 - Corte histológico cutâneo com coloração para lipídeos Sudam Red. Escore 3 (Objetiva de 10x).