

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Campus de Botucatu**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
DERMATOLÓGICA DE CÃES ATÓPICOS COM A UTILIZAÇÃO  
DE MALEATO DE OCLACITINIB**

**Orientado: José Francisco Antunes Ribeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado**

**Botucatu-SP**

**NOVEMBRO**

**2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Campus de Botucatu

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DERMATOLÓGICA  
DE CÃES ATÓPICOS COM A UTILIZAÇÃO DE MALEATO DE  
OCLACITINIB

JOSÉ FRANCISCO ANTUNES RIBEIRO

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de  
Araújo Machado

Botucatu-SP

NOVEMBRO, 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Ribeiro, José Francisco Antunes.

Avaliação da resposta inflamatória dermatológica de  
cães atópicos com a utilização de maleato de oclacitinib /  
José Francisco Antunes Ribeiro. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado  
Capes: 50501062

1. Dermatite atópica. 2. Cães. 3. Janus quinases. 4.  
Prurido. 5. Interleucinas.

Palavras-chave: Apoquel®; Canino; Dermatite atópica.

Nome: JOSÉ FRANCISCO ANTUNES RIBEIRO

Título: Avaliação da resposta inflamatória dermatológica de cães atópicos com a utilização de maleato de oclacitinib.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

Membro titular

Serviço de Dermatologia e Alergia da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia

PUCPR

Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

DATA DA DEFESA: 18/09/2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família que sempre acreditou em mim com todas as forças. A medicina veterinária sempre foi um sonho coletivo e mais essa etapa que dedico a eles: meus pais (Rosa e Sebastião) e meus irmãos (Juliano e Ana Paula). Cada degrau avançado é decorrente da força de vocês comigo!

Ao meu orientador Luiz Henrique de Araújo Machado por tanta ajuda presencial desde pré-residência, residência e pós residência, mas também por toda compreensão à distância! O Senhor é um exemplo não só de um profissional, mas também de pessoa, que sempre pude contar e aprender muito.

Professoras Tatiana, Malu e Alessandra por serem pessoas que me ajudaram desde meu início na FMVZ, que me ensinaram e mostraram tanto, em especial Professora Tatiana que me acompanhou por um tempo tão prolongado, serei eternamente grato.

Meu companheiro de vida, Luiz, por cada dia, cada batalha, sorriso, lágrimas e vitórias. Você torna o dia a dia mais fácil e leve, meu ponto de equilíbrio.

Minha irmã de alma, Joyce que me acompanha desde a primeira matéria da faculdade, que me mostra sempre como é bom viver, independente das dificuldades, vibrando a cada conquista e evolução.

Minha grande amiga Beatriz, que sei que posso contar a qualquer momento e qualquer situação, tenho certeza que juntos crescemos cada vez mais, tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

A todos os amigos e pacientes, que deixam um pedaço de si, permitindo com que eu seja melhor dia após dia.

*“Nem tudo na vida acontece do jeito que queremos, então cabe a nós termos a capacidade e positividade para nos adequarmos as situações que muitas vezes acontecem, para que consigamos alcançar nossos desejos”*

Arthur Peixoto

RIBEIRO, J.F.A. Avaliação da resposta inflamatória dermatológica de cães atópicos com a utilização de maleato de oclacitinib. Botucatu, 2019. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

Dermatite atópica (DA) canina é uma enfermidade alérgico-inflamatória de caráter crônico da pele, sendo realizado apenas tratamento suporte para melhora dos sinais clínicos. O maleato de oclacitinib é um inibidor de enzimas Janus Kinase (JAK) correlacionadas com citocinas pro-inflamatórias e pruridogênicas, e que possui ação rápida controlando o prurido. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta do maleato de oclacitinib, comparando o quadro clínico dermatológico com a resposta inflamatória pelas principais citocinas envolvidas nesse processo. Dez cães com diagnóstico de dermatite atópica foram tratados com maleato de oclacitinib durante 30 dias consecutivos e avaliados no início e no fim do tratamento, considerando as mudanças nas características clínicas e dosagens séricas das principais citocinas envolvidas no processo alérgico da DA, e por fim, correlacionar a evolução clínica com o comportamento dessas citocinas. As citocinas (IFN  $\gamma$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF  $\alpha$ ) foram dosadas pelo método de ELISA de amostras colhidas no dia 0 e no dia 30 de tratamento. Ao fim do estudo, pudemos conferir melhora significativa ( $p < 0,001$ ) das avaliações clínicas, com redução do prurido, do CADESI-04 e acompanhamento da IL-31, uma das principais citocinas envolvidas no prurido. Além disso, a utilização do maleato de oclacitinib reduziu todas as citocinas avaliadas durante esse curto período, questionando se, a utilização crônica, pode favorecer o aparecimento de infecções oportunistas e/ou a doenças neoplásica.

**Palavras-chave:** dermatite atópica, canino, Apoquel®

RIBEIRO, J.F.A. Evaluation of dermatological inflammatory response in atopic dogs using oclacitinib maleate. Botucatu, 2019. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **ABSTRACT**

Canine atopic dermatitis (AD) is an allergic inflammatory disease of chronic character of the skin, being only supportive treatment to improve clinical signs. Oclacitinib maleate is a Janus Kinase (JAK) enzyme inhibitor correlated with proinflammatory and pruridogenic cytokines, and has rapid action controlling pruritus. The aim of this study was to evaluate the response of oclacitinib maleate by comparing the dermatological clinical picture with the inflammatory response by the main cytokines involved in this process. Ten dogs diagnosed with atopic dermatitis were treated with oclacitinib maleate for 30 consecutive days and evaluated at the beginning and end of treatment, considering changes in clinical characteristics and serum dosages of the main cytokines involved in the allergic process of AD, and finally, correlate clinical evolution with the behavior of these cytokines. Cytokines (IFN  $\gamma$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 and TNF  $\alpha$ ) were dosed by ELISA on samples taken on day 0 and day 30 of treatment. At the end of the study, we could see a significant improvement ( $p < 0.001$ ) in clinical evaluations, with reduction of pruritus, CADESI-04 and follow-up of IL-31, one of the main cytokines involved in pruritus. In addition, the use of oclacitinib maleate reduced all cytokines evaluated during this short period, questioning whether chronic use may favor the onset of opportunistic infections and/or neoplastic disease.

**Keywords:** atopic dermatites, canine, Apoquel®

## **Sumário**

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Definição e epidemiologia .....	3
2.2. Patogênese.....	3
2.3. Ciclo do prurido.....	4
2.4. Diagnóstico da DAC.....	5
2.5. Tratamentos utilizados.....	6
2.5.1. Glicocorticóides.....	7
2.5.2. Ciclosporinas .....	7
2.5.3. Proteção da barreira epidérmica.....	8
2.5.4. Terapias tópicas.....	9
2.5.5. Maleato de Oclacitinib.....	9
2.6. Citocinas envolvidas na patogênese.....	11
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos .....	15
4. ARTIGO CIENTÍFICO .....	17
5. CONCLUSÕES .....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

# Capítulo I

## 1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica em cães (DAC) é uma dermatopatia inflamatória, crônica e pruriginosa, considerada atualmente como uma síndrome, com base genética associado a perda de barreira tegumentar, hiperreatividade imunológica, mormente da resposta Th2, e formação de citocinas inflamatórias, pruridogênicas e alergênicas, que levam à formação de anticorpos IgE principalmente contra alérgenos ambientais, alimentares e antígenos microbianos (DEBOER; MARSELLA, 2001; OLIVRY et al., 2010).

A barreira epidérmica não totalmente funcional em conjunto com os fatores exógenos e mutagênicos presentes levam a um processo inflamatório exacerbado e prurido, que piora as lesões por escoriações e auto traumatismo, e iniciam um ciclo de perpetuação do prurido, piorando os sinais clínicos de forma progressiva (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

Sendo assim, a DAC é uma síndrome que envolve muitos fatores e não apresenta cura, sendo que a inflamação e prurido crônicos associados à doença podem afetar significativamente a qualidade de vida desses animais e de seus proprietários, e seu tratamento multifocal e direcionado para o controle destes sinais clínicos à curto e longo prazo, e promoção de melhor qualidade de vida do cão acometido e de seus proprietários (GONZALES et al., 2016).

A redução do prurido é um dos componentes nesse tratamento e novos estudos surgem para que se testem produtos que causem redução no prurido, sem as reações adversas apresentadas pelas medicações utilizadas até então (GONZALES et al., 2016).

O maleato de oclacitinib (Apoquel®) é um fármaco recém comercializado, inibidor seletivo de Janus kinase 1 (JAK-1), que desempenha papel central na sinalização de várias citocinas pró-inflamatórias, pró-alergênicas e pruritogênicas, principalmente a IL-31, quebrando o ciclo do prurido e facilitando a introdução de tratamento integrativo (COLLARD et al., 2014).

Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruriginosas são componentes muito importantes dentro da DAC, e estudos baseados nos seus perfis durante a evolução da doença facilitam o seu entendimento e, assim, seu tratamento e controle (HALLIWELL; DEBOER, 2001). Dito isso, se torna interessante saber também o comportamento dessas citocinas durante o tratamento, permitindo intervenções terapêuticas adjuntas durante o controle da doença que possam favorecer o tratamento a longo prazo e minimizar efeitos colaterais.

Sendo assim, o objetivo desse estudo é avaliar cães diagnosticados com dermatite atópica e sua resposta à utilização do maleato de oclacitinib, correlacionado o quadro clínico dermatológico e as principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Definição e epidemiologia**

A dermatite atópica em cães (DAC) é uma dermatopatia alérgica, com base genética associado a fatores extrínsecos, que predispõe à inflamação e prurido com sinais clínicos característicos, associada a anticorpos IgE, mais comumente direcionados aos alérgenos ambientais (OLIVRY et al., 2010). Pode ser considerada uma síndrome, já que é um conjunto de sinais, principalmente, dermatológicos gerados por fatores ambientais em associação a fatores intrínsecos, como a presença de anticorpos IgE (DEBOER; MARSELLA, 2001).

Muitos alérgenos ambientais, como pólenes e ácaros, além de bactérias, leveduras e alérgenos alimentares podem desencadear uma resposta imunoalérgica excessiva, dando o início ao ciclo do prurido e piora dos sinais clínicos já presentes (OLIVRY et al., 2010).

A DAC representa uma das mais comuns dermatopatias em cães, com prevalência de 3-15% na população canina geral e representa entre 3% a 58% dos cães com doença de pele levados ao médico veterinário (SARIDOMICHELAKIS, M.N. e OLIVRY, T., 2016). Compartilha muitas características comuns com a dermatite atópica em humanos, como a predisposição familiar ou hereditária, aspectos histopatológicos e o prurido como sinal clínico primordial da doença (NODTVEDT et al, 2007; OLIVRY et al., 2010).

Assim como nos cães, em humanos com dermatite atópica os sinais clínicos também se iniciam em crianças e jovens, são geralmente perenes e o prurido prevalece nas regiões cervical, esternal, nas axilas, região inguinal e extremidades distais dos membros, sendo comum à presença de infecções recorrentes (MARSELLA; DE BENEDETTO, 2017).

### **2.2. Patogênese**

A DAC apresenta etiologia complexa e não totalmente elucidada, mas sabe-se que há correlação com alterações genéticas e principalmente com

fatores ambientais, que atravessam a barreira epidérmica não totalmente funcional causando os sinais clínicos.

A barreira epidérmica totalmente íntegra é a primeira proteção física do organismo contra alérgenos ambientais e agentes infecciosos. Estudos mostram que animais com DAC possuem uma deficiência importante nessa barreira e apresenta maior contato dos alérgenos ambientais com o sistema imune, contribuindo para uma resposta imunológica exacerbada (MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011; VILLALOBOS; BELTRÁN, 2016).

Além da disfunção da barreira, a infecção bacteriana e/ou fúngica da pele também pode piorar a inflamação, dificultando ainda mais o tratamento. O prurido desencadeado leva a lesões por escoriações e auto traumatismo, afetando ainda mais a qualidade da barreira epidérmica e piora dos sinais clínicos (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

Hoje, sabe-se que não somente fatores alérgenos ambientais são capazes de desencadear uma reação alérgica, mas também fatores presentes no alimento, contribuindo para proliferação de IgE e gerando os mesmos sinais clínicos que um alérgeno ambiental (MARSELLA; DE BENEDETTO, 2017).

### **2.3. Ciclo do prurido**

Com a reação inflamatória exacerbada ocorre o prurido, que pode ser generalizado ou focal, e que, independente da área, induz ao autotraumatismo, levando à infecção e piorando assim o prurido. Clinicamente esse ciclo é perceptível na grande maioria dos animais com dermatite atópica e levam à piora dos sinais clínicos de forma progressiva e desenvolvimento de escoriações, eczema, hiperqueratose e alopecia (PUCHEU-HASTON, 2016).

O ciclo do prurido tem cada vez mais sido foco de estudos na tentativa de bloquear qualquer ramo que o reduza, bem como suas lesões secundárias, tornando assim mais eficaz o tratamento. Algumas citocinas específicas fazem parte desse ciclo e novos estudos e medicamentos tem sido realizados para bloquear a suas ações (GONZALES et al., 2016).

Os clínicos devem ter em mente que nos estágios iniciais da DAC é improvável visualizar as lesões em todos os locais característicos e o prurido normalmente está presente, mesmo sem lesões aparentes (SANTORO, 2019).

A idade em que se iniciam os sinais da DAC é tipicamente entre seis meses e três anos, sendo que o mais importante é a presença do prurido, associado com lesões de pele com distribuição característica: ao redor da boca, olhos, orelhas, flexura de cotovelos, região de articulação de carpo e tarso, dígitos e região interdigital, abdômen ventral, períneo e face ventral proximal da cauda (SALZO, 2015; HENSEL et al., 2015; ).

#### 2.4. Diagnóstico da DAC

O diagnóstico da DAC é difícil, devendo ser baseado nos sinais clínicos característicos e histórico compatível, dentro dos critérios estabelecidos por Favrot *et al.* (2010) e exclusão de outras dermatopatias pruriginosas (OLIVRY et al., 2010).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico da DAC, os autores da *Task Force* Internacional sobre dermatite atópica canina (2010) apresentaram um conjunto de critérios a serem avaliados para auxiliar (Quadro 1), mas sendo importante lembrar que esses critérios não são absolutos e não devem ser aplicados unicamente, mas sim em associação com histórico e sinais clínicos compatíveis. No entanto, com a exclusão adequada de ectoparasitas e infecções dérmicas bacterianas e/ou fúngicas, a especificidade desses critérios deverá aumentar significativamente (OLIVRY et al., 2010).

QUADRO 1: Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico de dermatite atópica em cães

Início dos sinais clínicos antes de três anos de idade

Cães habitam normalmente ambientes internos

Prurido responsivo a corticosteroides

Prurido como sinal clínico inicial (prurido alesional)

Membros torácicos afetados

Pavilhões auriculares afetados

Margens de orelhas não afetadas

Area lombosacra não afetada

A presença de cinco dos critérios acima determina sensibilidade de 85% e especificidade de 79% para se diferenciar dermatite atópica canina de cães com prurido crônico recorrente sem dermatite atópica canina.

Caso se opte por seis critérios a especificidade aumenta para 89%, mas com queda de sensibilidade para 58%

Para aumentar a especificidade, o devido controle de ectoparasitas com medicações tópicas e/ou orais deve ser realizado, assim com a devida desinfecção ambiental durante um período de pelo menos 90 dias. Caso não haja melhora dos sinais clínicos, deve-se associar uma alimentação hipoalergênica, seja de dieta caseira ou ração comercial, durante um período de 8-12 semanas, sendo assim excluídas dermatite alérgica a picada de ectoparasitas e também hipersensibilidade alimentar (HENSEL et al., 2015).

## **2.5. Tratamentos utilizados**

Além da dificuldade diagnóstica, o tratamento na DAC também se torna uma problemática, já que esta morbidade não apresenta cura, somente controle, e o prurido crônico e intenso pode afetar significativamente a qualidade de vida desses animais e de seus proprietários (GONZALES et al., 2016).

### **2.5.1. Glicocorticóides**

De maneira geral, os glicocorticoides sistêmicos sempre foram muito utilizados para controle do prurido de cães com dermatite atópica, causando alívio momentâneo para animal e proprietário, mas seu uso crônico é associado com efeitos adversos graves, diminuindo o tempo de vida do animal, sendo cada vez menos utilizados na clínica dermatológica veterinária (ZANON et al., 2008)

Sistemicamente os glicocorticoides são usados em doses variáveis de 0,5- 1 mg/kg a cada 12 ou 24 horas e mesmo doses muito baixas utilizadas a longo prazo trazem efeitos adversos, como alterações gastrintestinais, renais, hepáticas, metabólicas e imunossupressão (ZANON et al., 2008).

A utilização sistêmica de glicocorticoides de forma crônica tende a apresentar menor eficácia, permanecendo principalmente as reações adversas (PUCHEU-HASTON, 2016). Sendo assim, sua maior indicação é em momentos de crises, podendo ser utilizado tanto na forma via oral quanto tópica, com menos absorção sistêmica e assim, menores efeitos adversos (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

### **2.5.2. Ciclosporinas**

Uma opção aos glicocorticoides sistêmicos, utilizada frequentemente, é o uso das ciclosporinas (por exemplo Sandimmun®), apresentando função imunomoduladora, atuando principalmente em linfócitos T, diminuindo a produção de IL-2, mas também apresentam efeitos adversos importantes, além de ser um imunossupressor de uso prolongado (PALMEIRO, 2013).

A ciclosporina, um inibidor de calcinerina, age não permitindo a ativação de linfócitos T ocorrendo a desregulação de várias citocinas pró-inflamatórias, inclusive IL-2 e IL-4, interferon (IFN)-  $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , principalmente em doses altas como 10 mg/kg a cada 12 horas (PALMEIRO, 2013).

A dose inicial deve ser de 5 mg/kg a cada 24 horas e deve ser revisada após pelo menos um mês de tratamento e após obter um controle da

sintomatologia, pode-se reduzir a dose em 25% ou administrá-la a cada 48 horas. Além disso, a ciclosporina pode ser utilizada em conjunto com os glicocorticoides na tentativa de reduzir a dose de ambos e atingir uma resposta inicial maior (OLIVRY et al., 2010).

Como efeitos adversos, podem ocorrer êmese após a administração da medicação, assim como anorexia e diarreia, além de apresentar a própria imunossupressão a longo prazo (OLIVRY et al., 2010; PALMEIRO, 2013). Muitos outros efeitos adversos são listados em menor escala, por exemplo: hiperplasia gengival, papilomatose cutânea, hipertricose, psoríase, onicogribose, hiperqueratose de coxins, alterações neurológicas e comportamentais, poliúria/polidipsia e perda de peso (PALMEIRO, 2013).

### **2.5.3. Proteção da barreira epidérmica**

É interessante ressaltar que ambas as medicações citadas até esse ponto são indicadas para fazer controle apenas do prurido, diminuindo as lesões secundárias ao auto traumatismo, mas ainda assim não há o tratamento da causa base. Portanto, novos estudos tem demonstrado que a proteção da barreira epidérmica se torna importante, diminuindo as perdas hídricas, o ressecamento da pele e conseqüentemente devem ser utilizados em associação (GONZALES et al., 2016; VILLALOBOS; BELTRÁN, 2016).

A barreira epidérmica é a primeira linha de proteção contra micro-organismos e agentes externos e sua integridade depende de vários fatores. Sabe-se que na DAC há a ocorrência de diminuição de ceramidas e lipídeos, alterações mutagênicas na filagrina – uma importante proteína para a formação da barreira epidérmica, sua diminuição favorece a perda hídrica da pele e a entrada de micro-organismos e substâncias, além de aumentar a sensibilização alérgica (MARSELLA; OLIVRY; CARLOTTI, 2011; MARSELLA; DE BENEDETTO, 2017).

Como dito anteriormente, o ciclo do prurido leva a piora da inflamação da pele, que resulta em uma piora na proteção da barreira epidérmica, sendo importante utilizar os tratamentos associados (MARSELLA; DE BENEDETTO, 2017).

#### **2.5.4. Terapias tópicas**

A proteção de barreira epidérmica pode ser favorecida pelos tratamentos tópicos existentes, sendo já muito relatado da sua eficácia e redução dos sinais clínicos, ou então, da sua utilização em associação com outros tratamentos para reduzir os efeitos adversos e menores doses de terapias sistêmicas (OLIVRY et al., 2010, 2015).

Além disso, também é muito importante o fator hidratação, que colabora tanto na proteção quanto na redução de prurido, como por exemplo óleos ou lipídeos presentes em shampoos, *rinses* ou soluções, que fazem uma certa barreira, reduzindo a perda de água transdérmica e também uma proteção física, utilizando umidade do ambiente ou também do subcutâneo (OLIVRY et al., 2010, 2015).

As terapias tópicas podem ser utilizadas principalmente a longo prazo mas também para reduzir a necessidade de terapias sistêmicas, e aqui podemos incluir terapias tópicas a base de glicocorticoides ou inibidores de calcinerinas, que vão apresentar menores efeitos adversos quando comparados aos produtos sistêmicos (MAYBA; GOODERHAM, 2016).

#### **2.5.5. Maleato de Oclacitinib**

As citocinas desempenham um papel chave em iniciar a estimulação neural do prurido crônico em cães com dermatite atópica, causando lesões de pele e um ciclo que exacerba as lesões de pele, aumenta os defeitos da função da barreira cutânea e favorece à infecções secundárias (PUCHEU-HASTON, 2016).

As *Janus Kinase* (ou JAK) são enzimas envolvidas em um dos mecanismos da resposta imunológica e alérgica, que se encontram ligadas a parte intracelulares de receptores de citocinas específicas. Assim que ocorre uma ligação de citocinas-receptores as JAK alteram sua conformação, o que permite sua ativação (SANTOS; MENDES; MORGADO, 2017)

As JAK ativadas são responsáveis pela fosforilação dos resíduos de seus receptores permitindo a ligação de proteínas responsáveis pela transdução do sinal (chamadas proteínas STAT) e, assim, ativação da transcrição de genes específicos que controlam determinados processos celulares como por exemplo: proliferação, diferenciação e apoptose, entre outros. (GONZALES; BOWMAN; FICI, 2014; SANTOS; MENDES; MORGADO, 2017).

Sendo assim, enzimas JAK atuam como mensageiras permitindo que sinais extracelulares (citocinas) indiquem ao núcleo de células específicas qual ação necessária pelas proteínas STAT (GONZALES; BOWMAN; FICI, 2014; SANTOS; MENDES; MORGADO, 2017).

Estudos baseados nesses mecanismos moleculares propiciam um progresso no desenvolvimento de novos tratamentos que causem menores efeitos adversos possíveis. Especificamente, o maleato de oclacitinib (Apoquel<sup>®</sup>) foi o primeiro fármaco inibidor seletivo de Janus kinase (JAK), particularmente JAK1 e JAK 2, desenvolvida para cães, que desempenha um papel central na sinalização de várias citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruritogênicas, incluindo IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31, que estão envolvidas em condições alérgicas (COLLARD et al., 2014).

O maleato de oclacitinib (Figura 1) foi aprovado para o controle do prurido associado à dermatites alérgicas, mormente o controle do prurido crônico da dermatite atópica em cães com mais de 12 meses de idade (COLLARD et al., 2014).

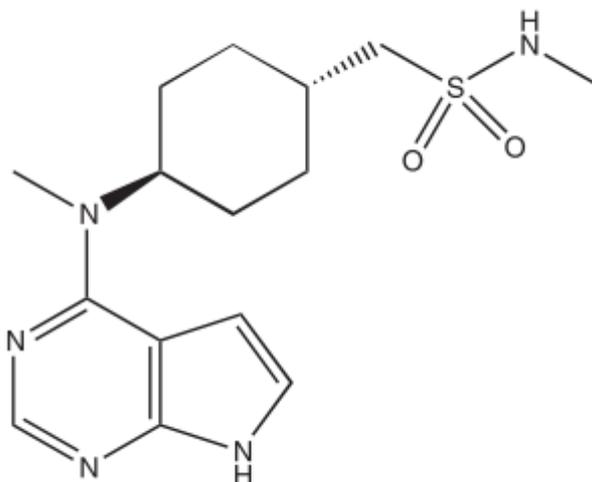


FIGURA 1- Estrutura química do oclacitinib, uma molécula de pirazolopirimidina de ciclohexilamino. Adaptado de: GONZALES, BOWMAN, FICI, 2014.

Oclacitinib atua principalmente em JAK 1 e 2, possuindo rápida absorção via oral e poucas reações adversas, por apresentar baixa especificidade em receptores JAK 3, responsáveis por hematopoiese, diferenciação celular e homeostase (SANTORO, 2019).

Comparativamente ao uso de glicocorticoides, um estudo demonstrou que sua rápida absorção é um ponto importante que levou à sua aprovação, sendo que comparado à prednisolona e dexametasona, o tempo de ação foi 10 vezes mais rápido (COLLARD et al., 2014).

Outro estudo, comparando o uso do oclacitinib e da ciclosporina, demonstra sua alta eficácia, principalmente nos primeiros dias de tratamento, havendo resultados mais positivos ao oclacitinib aos dias 1, 14 e 18 de tratamento, porém, sabe-se que a ciclosporina apresenta um maior tempo de ação inicial, dificultando essa avaliação (LITTLE et al., 2015).

## 2.6. Citocinas envolvidas na patogênese

Até o presente momento, a literatura disponível sobre a produção de citocinas por linfócitos T em cães com DAC não é muito ampla e não muito padronizada, mas se torna interessante saber o papel de cada uma e em quais momentos da doença elas atuam mais.

Sabe-se que a DAC tem influência de linfócitos Th1 e Th2, e que ambos produzem citocinas diferentes em momentos distintos da doença, sendo que Th1 produz IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF alfa, e Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 e IL31 (HALLIWELL; DEBOER, 2001), assim como as citocinas possuem uma maior seletividade por receptores específicos, conforme mostrado no quadro 2 (GONZALES, BOWMAN, FICI, 2014).

QUADRO 2. Principais citocinas correlacionadas a DAC. As citocinas possuem especificidade por receptores que, quando ligados, desencadeiam uma ação específica, conforme demonstrado. Adaptado de: GONZALES, BOWMAN, FICI, 2014.

Citocinas	Receptores	Principais ações
IL-2, IL-4 e IL-9	JAK1 e JAK3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crescimento e maturação de células linfoides.</li> <li>• Diferenciação e homeostase de células T</li> <li>• Inflamação</li> <li>• Alergia</li> </ul>
IL-10	JAK1 e Tyk2	Antiviral, anti-inflamatório e anti-tumoral
IL6, IL13 e IL-31	JAK1, JAK2 e Tyk2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflamação, prurido, alergia</li> <li>• Diferenciação celular e homeostase</li> </ul>

Em cães com dermatite atópica, a produção de citocinas pelos linfócitos Th2 está aumentada, principalmente em fases iniciais da doença, assim como em lesões agudas, sendo a IL4 com expressão aumentada em cães com DAC, quando comparada a animais com a pele saudável (NUTTALL et al. 2002), podendo ser produzidas também por mastócitos e basófilos (PUCHEU-

HASTON et al., 2015). A IL-4 apresenta sinergismo com TNF- $\alpha$  para a ativação de eosinófilos, colaborando com quadros alérgicos (WONG et al., 2001).

A IL-6 também correlaciona-se com linfócitos Th2, presentes em inflamação tanto de cães com DAC quanto não, apresentando multifuncionalidade, pois também aumentam em inflamações não específicas, ou seja, induzida por algum alérgeno ou não, por exemplo, mas ainda não há estudos que comprovem totalmente a sua ação (WONG et al., 2001; PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Já a IL-10 tem sua maior expressão por linfócitos Th1 e alguns estudos indicam que principalmente em animais com DA que estejam apresentando lesões de pele. Além disso apresentam funções regulatórias mediando inflamação causada por liberação de citocinas Th2 e até reduzir respostas imunes, mas esse mecanismo normalmente é esclarecido principalmente pela IL-6 quando há flogose da pele (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Poucos estudos foram feitos com a IL-17, principalmente quando correlacionadas a pele, mas sabe-se que ela também é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos Th17 ativados. Estudos humanos sugerem que seu aumento está correlacionado com a prevalência de outras citocinas pró-inflamatórias e outros fatores que favorecem a inflamação local e sistêmica (ALBANESI et al., 2000). Os linfócitos Th17 estão correlacionados também com a regulação de resposta imunológica inata e estudos sugerem que a IL17 possui ação e certa proteção contra infecções bacterianas (BRANDT; SIVAPRASAD, 2011).

A principal interleucina correlacionada com a DAC é a IL-31, que vem sendo muito estudada devido a sua correlação com prurido na dermatite atópica em animais e humanos. Sabe-se que ratos com sua expressão elevada apresentam sinais de prurido grave, alopecia autoinduzida, infiltração celular inflamatória e lesões dermatológicas (GONZALES et al., 2016).

Comparativamente à cães, sabe-se que em humanos, a IL-31 também apresenta papel importante na dermatite atópica, se permanecendo em concentrações importantes tanto em amostras de pele ou sangue de pacientes com a enfermidade (EZZAT; HASAN; SHAHEEN, 2011; KIM et al., 2011).

Sua produção é realizada por Th-2 ativados, além de mastócitos e queratinócitos, assim como linfócitos T residentes da pele, estando aumentada

em pacientes humanos com prurido exacerbado, havendo uma correlação da sua concentração sérica com dermatites atópicas mais graves (GONZALES et al., 2016).

A tentativa de correlacionar o comportamento das interleucinas com os sinais clínicos presentes se torna muito importante, facilitando tanto o diagnóstico de doenças como a DAC, como também o tratamento, e o enfoque de novos estudos trilham para tentar alterar a ação ou produção dessas citocinas conforme a necessidade da doença em questão e, assim, fornecer melhor qualidade de vida aos pacientes, unindo o controle do prurido à melhora da barreira epidérmica e da hiperreatividade tegumentar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a resposta clínica e inflamatória de cães com dermatite atópica utilizando maleato de oclacitinib.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a utilização do maleato de oclacitinib comercial na resposta clínica inflamatória de pacientes com dermatite atópica, por meio de avaliação clínica e de citocinas inflamatórias.
- Correlacionar a resposta clínica (por meio da avaliação de parâmetros específicos de prurido e alterações dermatológicas) com respostas Th1 e Th2.

## Capítulo II

# Trabalho científico

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Dermatology (ISSN: 1365-3164; Eur Soc of Vet Dermatology). Site da revista: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3164](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3164).

As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3164/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3164/homepage/ForAuthors.html)

## AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CUTÂNEA DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA UTILIZANDO MALEATO DE OCLACITINIB

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

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

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

Resumo – A dermatite atópica canina (DAC) considerada atualmente como uma síndrome com base genética associada a fatores extrínsecos, apresenta correlações com citocinas envolvidas no processo inflamatório e pruridogênico. O sinal clínico mais relatado é o prurido, levando a piora da pele e cronificação da doença. Novos estudos focados no tratamento com controle do prurido tem sido eficazes, havendo melhora da sintomatologia e maior facilidade no controle da doença.

Objetivos – Avaliar a utilização do maleato de oclacitinib comercial na resposta clínica inflamatória de cães atópicos e correlacionar com a mensuração sérica e dosagem de níveis de IFN gama, IL-1 alfa, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF alfa.

Animais – Foram utilizados 10 cães sem distinção de sexo, raça, porte e idade, diagnosticados com dermatite atópica.

Métodos – Selecionados pacientes atópicos e utilizado o tratamento com maleato de oclacitinib (Apoquel®; Pfizer Itália S.R.L., Marino del Tronto, Ascoli Piceno (AP), Italia), 0,6mg/kg de peso vivo, administrado a cada 12 horas nos 14 primeiros dias e a cada 24 horas nos 16 dias subsequentes, conforme indicado pelo fabricante. Os níveis séricos das citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF $\alpha$  foram determinados por ELISA e associados a resposta clínica.

Resultados – Após os 30 dias de tratamento, os pacientes apresentaram melhora clínica significativa e redução de citocinas importantes correlacionadas a dermatite atópica canina.

Conclusão – Foi possível inferir que houve redução dos sinais clínicos, melhora dos escores avaliados de forma significativa e redução de todas as citocinas dosadas, principalmente a IL-31, mas não houve correlação significativa entre dosagens de citocinas e avaliação clínica.

## INTRODUÇÃO

A dermatite atópica em cães (DAC) pode ser considerada uma síndrome, envolvendo um conjunto de sinais clínicos dermatológicos decorrentes de alterações genéticas em associação a fatores extrínsecos, associados a anticorpos IgE, mais comumente direcionados aos alérgenos ambientais, desencadeando inflamação e prurido crônico (1,2). A inflamação induz disbiose e o prurido à autotraumatismo, o que favorece à infecções estafilocócicas, malasseziose e um ciclo de piora dos sinais clínicos de forma progressiva, associado à escoriações, eczema, hiperqueratose e alopecia (3).

A DAC é uma doença que não apresenta cura e a inflamação e prurido crônicos associados à doença podem afetar significativamente a qualidade de vida desses animais e de seus proprietários, sendo seu tratamento direcionado para o controle destes sinais clínicos à curto e longo prazo, e promoção de melhor qualidade de vida ao cão acometido e seus proprietários (4).

Por muito tempo utilizou-se glicocorticoides e outros imunomoduladores na tentativa de controlar o prurido causado pela doença que embora eficazes no controle do eczema, são associados à múltiplos efeitos colaterais à longo prazo (5). Novos fármacos que levem à uma redução imediata do prurido e possam ser utilizados de forma regular sem indução de efeitos colaterais deletérios são alvos de recentes investigações (4).

Mecanismos moleculares envolvidos na deflagração do prurido têm sido investigados, bem como o papel das citocinas na estimulação neuronal do prurido crônico associado à dermatite atópica (3). Na DAC, a influência de linfócitos Th2 em fase inicial, e Th2 e Th1 em fases crônicas da doença, levam a produção de várias citocinas, sendo que Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 e Th1 produz IL-2 e IFN- $\gamma$ . A principal interleucina envolvida na DAC é a IL-31 e a avaliação de seu comportamento, assim como das outras citocinas envolvidas facilita o entendimento da doença, assim como seu tratamento e controle (4,6).

O maleato de oclacitinib (Apoquel®; Pfizer Itália S.R.L., Marino del Tronto, Ascoli Piceno (AP), Italia) foi o primeiro fármaco inibidor seletivo de *Janus kinase* (JAK), que desempenha um papel central na sinalização e

produção de várias interleucinas (IL) pró-inflamatórias, pró-alérgicas e prurítogênicas, incluindo IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31, controlando de forma rápida e eficaz uma das vertentes da doença (7).

Sabe-se que o maleato de oclacitinib inibe a sinalização das citocinas Th2, mas há poucos dados sobre o perfil destas durante o período de tratamento. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as concentrações das interleucinas IFN gama, IL-1 alfa, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF alfa e correlacionar com os aspectos clínicos, principalmente prurido e alterações dermatológicas durante o uso de oclacitinib.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos realizados nos animais do presente estudo foram avaliados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ Unesp Botucatu (CEUA), e aprovado (nº 200/2016), sendo que todos os proprietários que anuíram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a colheita de materiais e utilização dos dados em publicações.

### **Animais**

Foi realizado um estudo longitudinal sistematizado, não controlado/não randomizado, em que foi selecionado um grupo de 10 cães com dermatite atópica, sem predileção por gênero ou raça, adultos, provenientes da rotina dermatológica da FMVZ Unesp campus Botucatu-SP e de clínicas veterinárias particulares de referência. Os exames dermatológicos e colheita das amostras foram realizados pelo Serviço de Dermatologia Veterinária da FMVZ-UNESP Campus Botucatu e por médicos veterinários em clínicas veterinárias particulares.

Os animais com histórico e sinais clínicos compatíveis de dermatite atópica passaram por exclusão de outras dermatopatias pruriginosas ou alérgicas causadas por ectoparasitas (como escabiose e dermatite alérgica à picada de pulgas), assim como infecções bacterianas ou fúngicas.

Posteriormente, esses animais passaram por exclusão de alergia *alimentar strictu sensu* com o uso de dieta caseira ou comercial com proteína original durante um período de 5-8 semanas. Os animais que mantiverem os sinais clínicos, principalmente o prurido, e obedeciam à cinco ou seis dos critérios estabelecidos por Favrot *et al.*, (2010) obtiveram diagnóstico de dermatite atópica, sendo considerados aptos a participarem do estudo.

É importante considerar que todos os cães selecionados possuíam escore de condição corporal (ECC) médio (aproximadamente 4/9) e excluídas outras doenças crônicas que possam causar quadros pró-inflamatórios para que não ocorresse interferência no estudo.

### **Delineamento Experimental**

Após a exclusão e diagnóstico dos cães com dermatite atópica, se deu início a coleta de amostras sanguíneas, bem como as realizações da avaliação clínica dermatológica, principalmente escala visual de prurido (pVAS) e CADESI-04, dando início ao tratamento conforme estipulado por 30 dias. Após o tratamento, houve uma nova avaliação desses animais, repetindo os mesmos parâmetros (Figura 1).

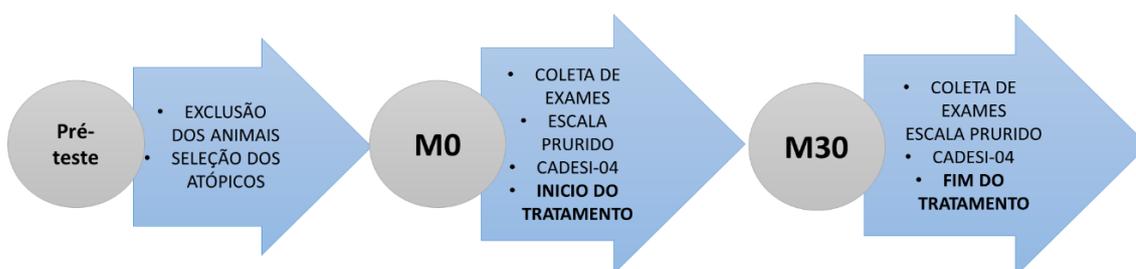


FIGURA 1. Delineamento experimental

### **Tratamento estabelecido**

Todos os animais receberam o tratamento maleato de oclacitinib (Apoquel®; Pfizer Itália S.R.L., Marino del Tronto, Ascoli Piceno (AP), Italia), 0,6mg/kg de peso vivo, administrado a cada 12 horas nos 14 primeiros dias e a cada 24 horas nos 16 dias subsequentes, conforme indicado pelo fabricante.

## Avaliação do prurido

O grau de prurido foi mensurado no início, ou seja, no dia 0 e após 30 dias, na data das coletas das amostras e avaliado segundo o escore de prurido de pVAS (*Pruritus Visual Analog Scale*) (8), conforme mostrado na figura 2, sendo os tutores dos animais questionados para que atribuam uma nota de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e posteriormente para que mostrasse em que grau da escala de escore de prurido de pVAS o animal se encaixava (prurido esclarecido), onde na escala apresentava apenas as classificações, sem as numerações.

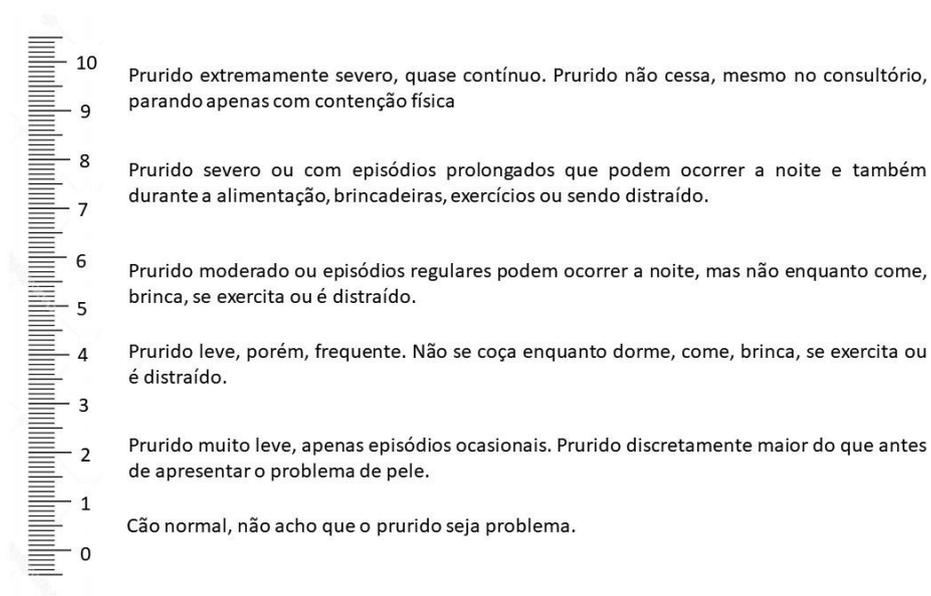


FIGURA 2. Escore de prurido. Adaptado de Hill; Lau; Rybnicek. (2007).

## Avaliação dermatológica e índice lesional

Além da avaliação do prurido, também analisou-se informações relativas às lesões tegumentares comuns da dermatite atópica como eritema, eritrodermia, liquenificação, prurido, escoriações e alopecia auto-induzida, avaliadas de acordo com a escala CADESI-4 (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) elaborada e validada por Olivry *et al.* (2014).

A escala CADESI-4 inclui a avaliação das 20 regiões do corpo mais afetadas em cães com dermatite atópica, avaliando lesões agudas e crônicas. Nesta validação três lesões (eritema, liquenificação e alopecia/escoriação) foram pontuadas quanto a gravidade em: 0 (nenhuma), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (grave) em cada região, conforme demonstrado na tabela 1.

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

CADESI-04 (ICADA)		Eritema	Liquenificação	Escoriação e/ou alopecia	TOTAL
Área Perilabial (combinação direita e esquerda)	1				
Pavilhão auricular	Esquerdo	2			
	Direito	3			
Axila	Esquerdo	4			
	Direito	5			
Membros torácicos (lados combinados dorsal e palmar)	Esquerdo	6			
	Direito	7			
Membros pélvicos (lados combinados dorsal e palmar)	Esquerdo	8			
	Direito	9			
Flexura de cotovelo	Esquerdo	10			
	Direito	11			
Metacarpo Palmar (do carpo até os coxins)	Esquerdo	12			
	Direito	13			
Flancos	Esquerdo	14			
	Direito	15			
Áreas inguinais	Esquerdo	16			

(virilhas)	Direito	17				
Abdômen		18				
Períneo (a partir de vulva/escroto até o ânus)		19				
Cauda ventral		20				
Grau de cada local e cada tipo de lesão:  Nenhuma: 0; Leve: 1; Moderado: 2; Severo: 3		<b>Total de pontos:</b> (20x3x3=180)				

### Coleta das amostras sanguíneas

As amostras de sangue venoso foram colhidas por venopunção jugular no dia 0, ou seja, previamente ao início da medicação e 30 dias após.

Aproximadamente 5 minutos após devida transferência das amostras para tubos estéreis com gel ativador de coágulo e a formação do coágulo, esses tubos foram centrifugados em uma centrífuga de 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e armazenadas em nitrogênio líquido, a -196°C para posterior dosagem das citocinas.

### Dosagem sérica de citocinas

Os níveis séricos das citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-31 e TNF $\alpha$  foram determinados utilizando os Kits comerciais Nori® Canine ELISA Kit DataSheet (Genorise, Philadelphia, PA, USA) e da citocina IFN-gamma utilizando-se dos Kits comerciais RayBio® Canine IFN-gamma ELISA Kit (Raybiotech, Norcross, GA, USA) seguindo as recomendações dos fabricantes.

A avaliação da quantidade de citocinas foi mensurada como se segue: 100 $\mu$ L de anticorpos específicos para cada citocina (anticorpos de captura) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato adicionados as placas de alta afinidade (Maxisorp-Nunc) e incubados "overnight" a 4°C. Após lavagem dos

poços, estes são neutralizados com uma solução proteica pobre em gordura (leite desnatado) para saturação dos sítios de ligação. As amostras dos sobrenadantes foram diluídas em PBS-Tween contendo 3% de leite desnatado e incubadas por 2 horas à 4°C. Após nova lavagem, foram adicionados aos poços 100µL de anticorpo biotilado anti-citocina e incubados por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem, foram adicionados aos poços o conjugado avidina-peroxidase (1 hora) e a reação é revelada com a adição de solução contendo peróxido de hidrogênio e ortofenilenodiamina (OPD). Após 15 minutos de incubação em local protegido de iluminação, a reação é bloqueada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, procedendo-se a leitura da reação em um leitor de ELISA com filtro de 492nm.

### **Análise estatística**

Para as variáveis com distribuição normal de probabilidades, descritas pela média e desvio-padrão utilizou-se o teste *t de student* para amostras pareadas. Na ausência da normalidade, variáveis descritas pela mediana a valores mínimo e máximo, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (9)

As avaliações de correlação foram demonstradas pelo coeficiente de correlações linear entre os pontos Spearman (9).

Os dados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Todos os gráficos foram realizados com a ajuda do software GraphPad prism 5.1.

## **RESULTADOS**

### **Dados epidemiológicos da população do estudo**

Nesse estudo, foram utilizados 10 cães com diagnóstico de dermatite atópica (tabela 1). Dentre eles, 50% era macho e 50% fêmea, com idade variável (de 6 meses a 14 anos) e 80% dos animais possuía raça específica, sendo os mais comuns Golden Retriever e Shih Tzu.

Variável		Valor
Raça [n (%)]	Golden Retriever	2 (20)
	Beagle	1 (10)
	Poodle	1 (10)
	Shih tzu	2 (20)
	Sem raça definida	2 (20)
	Lhasa apso	1 (10)
	Bulldog francês	1 (10)
Idade média (variação) (anos)		5,9 (0,5-14)
Sexo [n (%)]	Macho	5 (50)
	Fêmea	5 (50)

Tabela 1. Dados epidemiológicos da população do estudo

### Avaliação da resposta clínica

Em relação a resposta clínica dos pacientes que utilizaram o maleato de oclacitinib durante 30 dias, foram obtidos resultados com valores significativos, avaliados pela escala de prurido e pela avaliação do CADESI-04 (tabela 1).

Avaliação	Momentos		Valor p
	M0	M30	
Prurido	6,7 ( $\pm$ 1,5)	2,9 ( $\pm$ 0,7)	p < 0,001
CADESI-04	58,8 ( $\pm$ 17,6)	22,3 ( $\pm$ 4,7)	p < 0,001

Tabela 1. Média, desvio-padrão e valor de p da avaliação clínica dos pacientes nos momentos 0 e 30.

Avaliando os pacientes pelo escore de prurido, conforme mostrado na figura 3, 90% apresentou queda durante o tratamento, sendo que apenas um paciente manteve o mesmo escore de prurido.



Figura 3. Escala de prurido de 10 cães atópicos no momento inicial e após 30 dias de tratamento com maleato de oclacitinib, mostrando a redução do escore de prurido de 90% dos animais.

A avaliação do CADESI-04 também apresentou redução significativa (Figura 4).

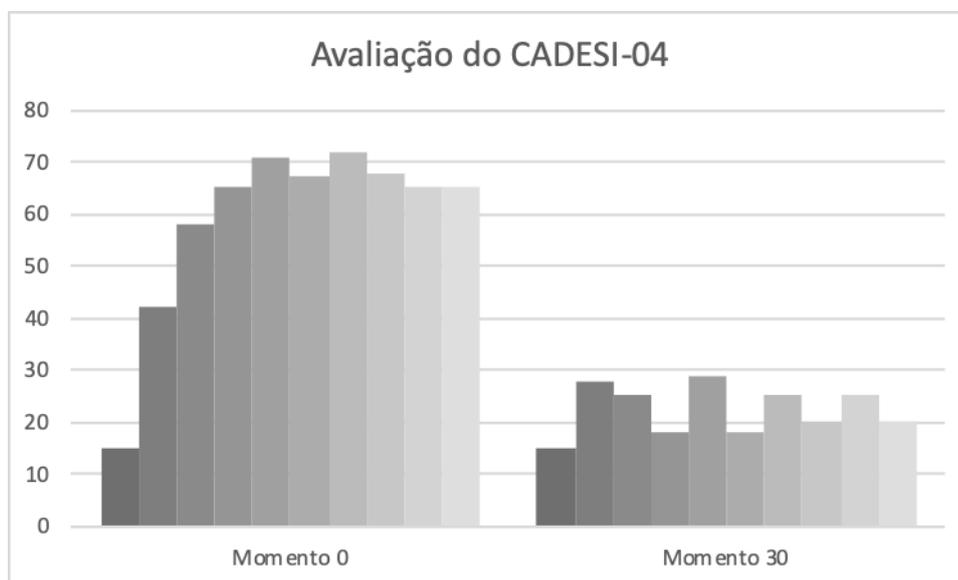


Figura 4. Gráfico demonstrando a redução das notas avaliadas pelo CADESI-04 de 90% dos animais avaliados, no momento inicial e após 30 dias de tratamento com maleato de oclacitinib.

### Dosagem das citocinas

Complementando a avaliação clínica realizada durante o período de 30 dias de tratamento com o maleato de oclacitinib, foram dosadas as citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruritogênicas (tabela 2), apresentando resultado com valor significativo apenas na IL-31.

Citocina	Momentos		Valor p
	M0	M30	
IL-1	2,2 (1,5;34,9)	2,0 (1,5;34,6)	p > 0,05
IL-4	41,1 (2,8;740,7)	18,2 (3,4;1091,4)	p > 0,05
IL-6	66,2 (14,9;2409,7)	47,2 (19,3;2079,1)	p > 0,05
IL-10	21,3 (15,5;380,3)	18,5 (14,3;359,5)	p > 0,05
IL-17	50,5 (27,1;352,8)	40,0 (8,7;424,0)	p > 0,05
IL-31	59,2 (8,6;430,0)	40,9 (4,7;270,0)	p = 0,002
IFN- $\gamma$	0,41 ( $\pm$ 0,19)	0,32 ( $\pm$ 0,16)	p > 0,05
TNF- $\alpha$	102,9 (17,0;1694,0)	76,6 (18,8;1889,3)	p > 0,05

Tabela 2. Mediana (valor mínimo; valor máximo) e média e desvio-padrão das citocinas dosadas no período inicial (M0) e final (M30) de tratamento com maleato de oclacitinib.

Médias e medianas apresentadas nos resultados da avaliação do prurido, CADESI-04 e IL-31, estão representadas na figura 5, demonstrando uma diminuição significativa da IL31 e dos sinais clínicos associados à DA em cães após 30 dias de tratamento com maleato de oclacitinib.

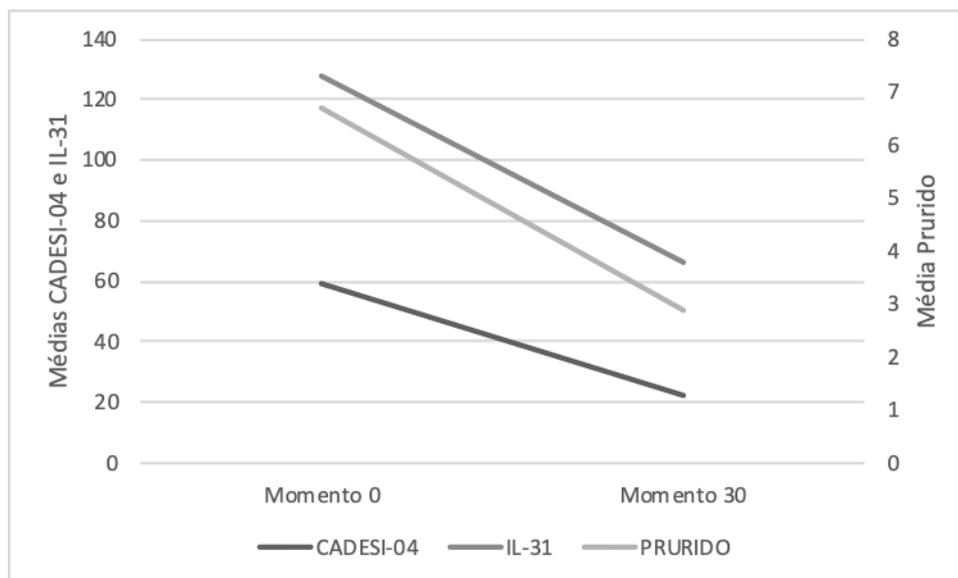


Figura 5. Gráfico comparando as médias da avaliação do prurido, CADESI-04 e IL-31, no início (M0) e após 30 dias de tratamento (M30), sendo possível conferir a redução acompanhada das avaliações, ou seja, redução das médias de CADESI-04, IL-31 e prurido.

Todos os animais avaliados apresentaram redução da IL-31 nos comparando os momentos 0 e 30, conforme demonstrado na figura 6.

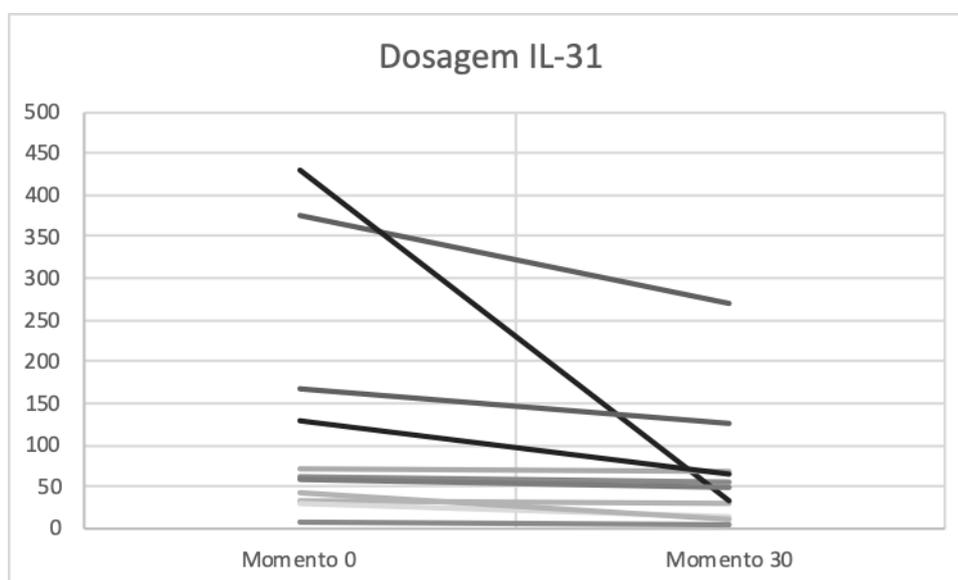


Figura 6. Gráfico demonstrando as concentrações de IL-31 de cada animal nos momentos 0 e 30 do estudo, sendo possível visualizar a redução em todos os animais, comparando o momento 0 com o momento 30.

### Correlação clínica x citocinas

A concentração de cada citocina e sua correlação com os escores clínicos lesionais (CADESI) e a escala visual de prurido (pVAS) estão demonstrados na tabela 3.

Variável	Variável	
	CADESI-04	Prurido
IL-1	-0,232	-0,181
IL-4	-0,193	0,042
IL-6	-0,261	-0,158
IL-10	-0,228	0,063
IL-17	-0,024	0,126
IL-31	-0,091	0,090
IFN- $\gamma$	0,282	0,178
TNF- $\alpha$	-0,188	-0,025

Tabela 3. Medida de associação linear de Spearman entre as citocinas avaliadas com escore de CADESI-04 e prurido.

Todas as correlações realizadas entre citocinas e parâmetros clínicos mostraram-se não significativas .

### DISCUSSÃO

A dermatite atópica em cães (DA) é uma síndrome clínica associada principalmente ao prurido crônico e, conseqüentes lesões cutâneas. Este se estabelece devido à associação da perda de barreira tegumentar com hiperreatividade imunológica, mormente da resposta Th2, a alérgenos ambientais, alimentares e antígenos microbianos (2).

O presente estudo demonstra a eficácia do maleato de oclacitinib utilizado durante 30 dias em controlar o ciclo do prurido e reduzir as lesões dermatológicas, promovendo melhora clínica.

O principal sinal clínico da DA é o prurido, geralmente intenso a grave e crônico. Assim, a melhora significativa do prurido que conduz à minimização das lesões, pois estas, na sua maioria, são autoinflingidas, e por consequência, com o controle do prurido, há redução das lesões dermatológicas.

A avaliação do prurido pela escala pVAS, em somatória com a resposta do CADESI-04, é uma forma eficaz de predizer sobre evolução clínica desta morbidade. Nesse estudo, ambos os parâmetros apresentaram redução significativa após o tratamento, corroborando com estudos que demonstram a eficácia do oclacitinib por sua ação em receptores JAK-1 (4,10).

Ainda, segundo CADESI-04, 70% dos animais iniciaram o estudo com dermatite atópica grave, apresentando importantes pontos de liquenificação, eritema e escoriações, normalmente disseminadas. Após os 30 dias de tratamento com maleato de oclacitinib, 100% dos animais se encontravam na classificação de dermatite atópica leve, ou seja, apresentando importante queda na somatória de pontos, normalmente, permanecendo lesões localizadas e de caráter crônico, que necessitariam de maior tempo de tratamento e acompanhamento.

Sabe-se que as lesões crônicas na DA estão principalmente relacionadas à resposta Th1. O oclacitinib em dose de manutenção atua principalmente nas citocinas Th2, principalmente na diminuição da IL-31 e no controle do prurido, tendo pouca influência na inflamação e liquenificação, assim, a redução do CADESI-04 está correlacionado apenas a controle do prurido.

Em relação às citocinas, se forem observadas as medianas e médias presentes, todas apresentaram redução dos valores, sendo que algumas mais evidentes do que outras, principalmente as Th2 (IL-4, IL-6, IL-31). Sabe-se que em humanos alérgicos há uma prevalência de linfócitos Th2, e tanto na DA humana quanto em cães, essa prevalência também ocorre, sendo esses produtores da maior parte das citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e

pruritogênicas (6,11). Como o maleato de oclacitinib inibe principalmente receptores JAK 1, a tendência é uma redução de citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31 (7), como observado no presente estudo.

Dentre as interleucinas, a IL-31 é uma citocina mais correlacionada com prurido e é amplamente presente na DA, fato também observado no presente estudo, sendo observado um valor importante de IL-31 no momento 0 dos cães avaliados.

Além disso foi possível observar que com o tratamento houve redução significativa das concentrações de IL-31 em todos os pacientes, acompanhado da redução, também significativa, do prurido e sinais clínicos de DA, conforme também observado por GONZALES; BOWMAN; FICI (2014), o que denota a importância desta citocina como elemento pruritogênico em cães com DA.

Porém, os momentos de coleta foram nos dias 1 e 30, sendo que no período final (m30), os animais estavam utilizando o fármaco a cada 24h. Quando em dose de manutenção (a cada 24 horas), o maleato de oclacitinib inibe principalmente a citocina IL-31, e por um período de até 4 horas. Possivelmente por isso, não se observou minimização significativas nas demais citocinas.

Sabe-se que o maleato de oclacitinib age principalmente em receptores de citocinas correlacionadas a linfócitos Th2, mas essa resposta é dose-dependente, ou seja, a inibição de cada citocina é variável de acordo com a dose, sendo assim, supõe-se que se a avaliação do estudo tivesse sido realizada aos também aos 15 e 30 dias, possivelmente teríamos observado reduções significativas em outras citocinas Th2 e não somente da IL-31.

Utilizando o maleato de oclacitinib a cada 12 horas, acredita-se que é possa reduzir de forma significativa as citocinas pruritogênicas e alergênicas Th2, e minimizar a formação de citocinas pró inflamatórias Th1, principalmente o TNF alfa, isso minimizaria a inflamação e o prurido e tiraria do cão da crise (10).

Já apenas com a dose de manutenção, o efeito do oclacitinib ocorre principalmente sobre a IL-31, mantendo o animal com prurido mínimo e evitando assim a recorrência das lesões.

Chama à atenção uma tendência a diminuição do TNF alfa, mesmo nas doses de manutenção. A inibição crônica do TNF- $\alpha$  pode minimizar a resposta imune inata e favorecer o aparecimento de infecções oportunistas, além de predisposição à doenças neoplásicas (12).

Outro dado interessante é a tendência a redução da citocina IL-17, que pode causar diminuição da produção de peptídeos antimicrobianos e de ceramidas, diminuindo a barreira da pele e favorecendo à disbioses, infecções estafilocócicas recorrentes e malasseziose (13).

Pelos resultados demonstrados, tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-17 não obtiveram alterações significativas, mas considerando a redução de ambas, que pode ser visualizada na tabela 2, se torna um ponto importante de futuros estudos, principalmente considerando a utilização do fármaco a longo prazo (mais de 30 dias) ou mesmo durante a fase de indução (dose a cada 12 horas), podendo predispor a maiores infecções oportunistas e predisposição a neoplasias.

Dos resultados apresentados avaliando as concentrações de tanto a IL-31 quanto as demais citocinas, e, comparando com as notas da escala de prurido e CADESI-04 de cada animal não foi possível realizar uma correlação.

Essa ausência de correlação positiva entre as concentrações de citocinas, prurido e lesões nos momentos 0 e 30, pode estar relacionado ao fato que foi avaliado as citocinas séricas. Em geral, as Th2 são liberadas por estes linfócitos na pele, além de mastócitos na derme papilar e linfócitos T residentes. Estas citocinas têm efeitos regionais, e a IL-31 possui receptores nas fibras axonais periféricas (13). Talvez suas concentrações na pele sejam maiores que as séricas, o que justificaria a redução tão significativa do prurido e das lesões, e sua não documentação sistêmica.

Além disso, é importante salientar que o oclacitinib inibe as enzimas JAK, reduzindo a ação das citocinas relacionados e não necessariamente atua

minimizando as concentrações séricas das citocinas, ocorrendo redução das citocinas por decorrência do controle dos sinais clínicos.

Outro ponto a ser considerado é que houve uma variação muito grande das concentrações de citocinas, podendo ser analisada pela tabela 2, apresentando as medianas com os números máximos e mínimos. Isso questiona se há uma falta de padronização dos Kits de ELISA ou se há realmente uma variação subjetiva de animal para animal, ainda assim, outros estudos também utilizam os kits de ELISA para a dosagem de várias citocinas (14–16).

## **CONCLUSÕES**

A utilização do maleato de oclacitinib durante 30 dias minimiza as concentrações séricas da IL-31, a intensidade do prurido e as consequentes lesões tegumentares em cães com dermatite atópica.

## **AGRADECIMENTOS**

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

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): The relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81(3–4):239–49.
2. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet*

- Dermatol. 2010;21(3):233–48.
3. Pucheu-Haston CM. Atopic dermatitis in the domestic dog. *Clin Dermatol* [Internet]. 2016;34(2):299–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2015.10.010>
  4. Gonzales AJ, Fleck TJ, Humphrey WR, Galvan BA, Aleo MM, Mahabir SP, et al. IL-31-induced pruritus in dogs: A novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. *Vet Dermatol*. 2016;27(1):34-e10.
  5. Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J* [Internet]. 2016;207:29–37. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109002331500386X>
  6. Halliwell REW, Deboer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis ( III ): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. 2001;81:159–67.
  7. Collard WT, Hummel BD, Fielder AF, King VL, Boucher JF, Mullins MA, et al. The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog. *J Vet Pharmacol Ther*. 2014;37(3):279–85.
  8. Hill PB, Lau P, Rybnicek J. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. 2007;301–8.
  9. Wildermuth K, Zabel S, Rosychuk RAW. The efficacy of cetirizine hydrochloride on the pruritus of cats with atopic dermatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Vet Dermatol*. 2013;24(6).
  10. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ. Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther*. 2014;37:317–24.
  11. Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(2):177–83.

12. Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Körner H. Tumor necrosis factor: a master-regulation of leukocyte movement. *Immunol Today*. 2000;21(3):110–3.
13. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol*. 2011;2(3):1–25.
14. Majewska A, Gajewska M, Dembele K, Maciejewski H, Prostek A, Jank M. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Vet Res* [Internet]. 2016;12(1):174. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0805-6>
15. Pantaleo M, Piccinno M, Roncetti M, Mutinati M, Rizzo A, Sciorsci RL. Evaluation of serum concentrations of interleukin (IL)-4, IL-10, and IL-12 during pregnancy in bitches. *Theriogenology* [Internet]. 2013;79(6):970–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.017>
16. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- $\gamma$ - and interleukin-4- induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2000;115(1):81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00041.x>

## Capítulo III

## 5. CONCLUSÕES

- A utilização do maleato de oclacitinib foi eficaz para o controle de prurido, levando a melhora clínica, visualizada e confirmada pelo CADESI-04 e pelo escore de prurido.
- O seu uso durante os 30 dias levou a mudanças na análise sérica das citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruritogênicas, principalmente na IL-31, havendo queda expressiva de seus valores decorrente do controle dos sinais clínicos e não que o fármaco tenha ação efetiva nas interleucinas
- Não houve correlação significativa com a redução do prurido e melhora do quadro clínico dos animais avaliados. Essas associações realizadas se mostram não significativas provavelmente devido ao fármaco atuar apenas na inibição de tais citocinas, realizando controle dos sinais clínicos, e, podendo inferir que as concentrações de citocinas são subjetivas e variáveis de acordo com a cronicidade das lesões e com cada animal do estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

ALBANESI, C.; SCARPONI, C.; CAVANI, A.; FEDERICI, M.; NASORRI, F.; GIROLOMONI, G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon- $\gamma$ - and interleukin-4- induced activation of human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 1, p. 81–87, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00041.x>>.

BRANDT, E. B.; SIVAPRASAD, U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. **Journal of Clinical & Celular Immunology**, v. 2, n. 3, p. 1–25, 2011.

COLLARD, W. T.; HUMMEL, B. D.; FIELDER, A. F.; KING, V. L.; BOUCHER, J. F.; MULLINS, M. A.; MALPAS, P. B.; STEGEMANN, M. R. The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 3, p. 279–285, 2014.

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

EZZAT, M. H. M.; HASAN, Z. E.; SHAHEEN, K. Y. A. Serum measurement of interleukin-31 ( IL-31 ) in paediatric atopic dermatitis : elevated levels correlate with severity scoring. **Journal of the European Academy of Dermatology**

**and Venereology**, v. 25, p. 334–339, 2011.

GONZALES, A. J.; BOWMAN, J. W.; FICI, G. J. Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, p. 317–324, 2014.

GONZALES, A. J.; FLECK, T. J.; HUMPHREY, W. R.; GALVAN, B. A.; ALEO, M. M.; MAHABIR, S. P.; TENA, J. K.; GREENWOOD, K. G.; MCCALL, R. B. IL-31-induced pruritus in dogs: A novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 34-e10, 2016.

HALLIWELL, R. E. W.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis ( III ): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. v. 81, p. 159–167, 2001.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 196, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4531508&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

KIM, S.; KIM, H.; YANG, H. S.; KIM, E.; HUH, I.; YANG, J. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 468–473, 2011.

LIMA, M. V. de F. B.; LIMA, E. R. de; RÊGO, M. S. de A.; PEREIRA, D. da S.; ARAÚJO, I. R. M. de; LIRA, C. C. dos S.; FREITAS, M. L. B.; SILVA, W. M.;

VASCONCELOS, K. F. de. Uso da ciclosporina na terapia de dermatite atópica. p. 1–2, [s.d.]

LITTLE, P. R.; KING, V. L.; DAVIS, K. R.; COSGROVE, S. B.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 23-e8, 2015.

MARSELLA, R.; DE BENEDETTO, A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 3, p. 37, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2306-7381/4/3/37>>.

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.

MAYBA, J. N.; GOODERHAM, M. J. Review of Atopic Dermatitis and Topical Therapies. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 3, p. 227–236, 2016.

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

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

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

PALMEIRO, B. S. Cyclosporine in Veterinary Dermatology. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 1, p. 153–171, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.09.007>>.

PUCHEU-HASTON, C. M. Atopic dermatitis in the domestic dog. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 299–303, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2015.10.010>>.

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, n. 2, p. 124-e32, 2015.

SANTORO, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 49, n. 1, p. 9–26, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.08.002>>.

SANTOS, D.; MENDES, S.; MORGADO, M. Inibidores das Janus Associated Kinases na Terapêutica Farmacológica. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 9, p. 21–34, 2017.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; OLIVRY, T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 207, p. 29–

37, 2016. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109002331500386X>>.

VILLALOBOS, W. R.; BELTRÁN, L. R. Importância da barreira epidérmica na dermatite atópica canina : Revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 7, p. 560–567, 2016. Disponível em:  
<<http://www.pubvet.com.br/artigo/2894/importacircncia-da-barreira-epideacutermica-na-dermatite-atoacutepica-canina-revisatildeonbsp>>.

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W. S.; CHAN, C. H. S.; HO, A. S. S.; HUI, D. S. C.; LAM, C. W. K. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 125, n. 2, p. 177–183, 2001.

ZANON, J. P.; GOMES, L. A.; CURY, G. M. M.; DA COSTA TELES, T.; DA COSTA VAL BICALHO, A. P. Dermatite atópica canina. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 29, n. 4, p. 905–920, 2008.